



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia

**SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA Y
DIGESTIBILIDAD EN RUMIANTES ALIMENTADOS CON
LEGUMINOSAS (*Pisum sativum*) Y CEREALES (*Sorghum
bicolor* L Moench y *Zea maiz*) PROCESADOS.**

TESIS

QUE, PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

M en C. ULISES ALEJANDRO GONZÁLEZ GARCÍA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Marzo 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia

SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA Y
DIGESTIBILIDAD EN RUMIANTES ALIMENTADOS CON
LEGUMINOSAS (*Pisum sativum*) Y CEREALES (*Sorghum*
***bicolor* L Moench y *Zea maiz*) PROCESADOS.**

TESIS

QUE, PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

ULISES ALEJANDRO GONZÁLEZ GARCÍA

COMITÉ TUTORIAL

DR. MANUEL GONZÁLEZ RONQUILLO

DR. LUIS CORONA GOCHI

DRA. JULIETA GERTRUDIS ESTRADA FLORES

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, Marzo del 2013

©Derechos Reservados, González, 2013

2.5.2.	Nitrógeno de la dieta	36
2.6.	Factores que afectan la degradación de la proteína y almidón en el rumen	37
2.6.1.	Características de la proteína	38
2.6.2.	Procesamiento del alimento	38
2.6.3.	Condiciones ruminales	39
2.6.4.	Tiempo de retención	39
2.6.4.1.	Nivel de alimentación	40
2.6.4.2.	Frecuencia de distribución del alimentación	40
2.6.4.3.	Tamaño de partícula	41
2.6.4.4.	Relación forraje concentrado	41
3.	Síntesis de proteína microbiana y su eficiencia	42
3.1.	Síntesis de proteína microbiana	42
3.2.	Estimación de la síntesis de proteína microbiana	43
3.2.1.	Aislamiento microbiano	44
3.2.2.	Factores que afectan el crecimiento microbiano	45
3.2.3.	Identificación de la proteína microbiana por medio de marcadores	46
3.3.	Tipos de marcadores	47
3.3.1.	Internos	48
3.3.1.1.	Ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)) y bases púricas.	48
3.3.1.2.	Derivados púricos.	51
3.3.1.3.	Lignina.	53
3.3.1.4.	FND y FDA indigestibles.	55
3.3.1.5.	Cenizas insolubles en ácido.	55
3.3.1.6.	Nitrógeno en heces.	56
3.3.1.7.	N – Alcanos	57
3.3.2.	Externos	59
3.3.2.1.	Oxido de Cromo	60
3.3.2.2.	N ¹⁵	61
3.3.2.3.	P ³²	64

3.3.2.4. Tierras raras	64
4. Técnicas de digestibilidad	65
4.1. <i>In vivo</i>	65
4.2. <i>In sacco</i>	66
4.3. <i>In vitro</i> (Producción de gas)	68
4.4. <i>In vitro</i> (incubador Daisy)	69
III. Planteamiento del problema	100
IV. Objetivos	102
V. Material y métodos	103
1.1. Experimento 1 Inclusión de heno de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.) y producción de gas <i>in vitro</i> en dietas para corderos en crecimiento.	103
1.2. Experimento 2. Comparación de técnicas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>in sacco</i> en la determinación ruminal e intestinal del grano de maíz (<i>Zea maíz</i>) y sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench).	103
1.3. Experimento 3. Características nutritivas del grano de sorgo (entero o quebrado) utilizando la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> .	106
1.4. Comparación de técnicas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>in sacco</i> en la determinación de la digestibilidad ruminal e intestinal del grano de sorgo reconstituido y ensilado.	107
1.5. Efecto del grano de sorgo, procesamiento, eficiencia alimenticia y síntesis de proteína microbiana en terneros	111
VI. Resultados y discusión	112
VII. Hoas de recepción	122
	146
VIII. Conclusiones	197

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de especies bacterianas del rumen de acuerdo al tipo de sustrato que fermentan (Yokoyama et al., 1998)	16
Cuadro 2. Clasificación por especies de protozoarios ruminales con los sustratos preferentemente fermentados (Van Soest, 1994)	19
Cuadro 3. Clasificación de los carbohidratos (Adaptado de Van Soest, 1982).	27
Cuadro 4. Modelos de predicción para la digestibilidad de la materia orgánica de forrajes de zonas templadas.	57
Cuadro 5. Recuperación de n – alcanos en duodeno e íleon terminal de heces de ovinos alimentados con rygrass perenne (<i>Lolium spp.</i>) fresco.	59
Cuadro 6. Valores de la relación N^{15}/N en muestras de bacterias (BAL: bacterias asociadas a la fase líquida; BAS: bacterias asociadas a la fase solida) y protozoarios aislados en el rumen.	63
Cuadro 7. Estandarización en las determinaciones <i>in situ</i> .	68

Índice de figuras

- Figura 1.** Sección a través del plano vertical mediano de preestómagos de rumiante vista por su lado derecho. ABO. Abomaso; D. duodeno; E. esófago; OM. Omaso; OOA. Orificio omaso-abomasal; ORO. Orificio retículo omasal; PA. Pilar transversal anterior; PCD. Pilar coronario dorsal; PM pilar coronario ventral; PL. Pilar longitudinal; PRD. Pilar reticular dorsal; PRV. Pilar reticular ventral; PTA. pliegue transversal anterior; R. rumen; RE. Retículo; SCD. Saco ciego dorsal; SCV. Saco ciego ventral; SDR. Saco ruminal dorsal; SVR. Saco ruminal ventral; → dirección del alimento durante ingestión y pasaje; - - → dirección de la digesta durante la rumia. 12
- Figura 2.** Metabolismo de los carbohidratos de los hongos. 21
- Figura 3.** Rutas metabólicas de los carbohidratos en el rumen (Adaptado de France et al. 1993; Jouany et al. 1995) 29
- Figura 4.** Metabolismo de las proteínas en el rumen. 32
- Figura 5.** Representación esquemática del metabolismo del nitrógeno en el rumen (Fuente: Beaver, 1993) 46
- Figura 6.** Incubador Daisy (Anlom Technology). 71
- Figura 7.** jarras con soluciones preparadas de acuerdo a ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU 71
- Figura 8.** Jarras digestoras dentro del incubador Daisy con temperatura controlada 71

Resumen

Los sistemas modernos de formulación de raciones para el ganado vacuno se basan en los conceptos de proteína digestible y el aporte de aa al intestino delgado del rumiante. De la calidad total de proteína sintetizada en el rumen y que llega al intestino delgado del rumiante, una proporción importante, aunque variable, corresponde a la proteína microbiana, la cual proviene, fundamentalmente, de las bacterias. Aunque la mayor parte de las bacterias están unidas a la parte sólida B(AS), en la mayoría de los estudios realizados se utilizan muestras de bacterias obtenidas de la fracción líquida del contenido ruminal (BAL). Existe información en la literatura que indica la diferencia en la composición química entre BAL y BAS, las cuales pueden estar relacionadas con importantes errores en la predicción del flujo de proteína y aa de origen microbiano. Otro factor importante que se debe tomar en cuenta se relaciona con la dieta (forraje:concentrado, nivel de fibra, tamaño de partícula, consumo de alimento...etc.) ya que pueden afectar la fermentación y el metabolismo proteico y con ello disminuir el aporte parcial de BAL y BAS y con ello el flujo de proteína o aa de origen microbiano. De igual forma, el flujo de BAL y BAS se ve alterada por los cambios producidos a nivel ruminal debido a variaciones en la dieta o en el tiempo de alimentación (pH, tasa de dilución). El estudio de los problemas antes mencionados *in vivo* es complicado, ya que la fermentación puede confundir la interpretación de los resultados. Existen diversos sistemas *in vitro* que nos ofrecen la oportunidad de estudiar cada uno de los factores de forma aislada. El objetivo del presente estudio, fue evaluar los diferentes métodos de digestibilidad y condiciones de fermentación, así como, el flujo de nutrientes y el perfil y flujo de aa de origen microbiano utilizando la excreción de derivados púricos (DP).

I. INTRODUCCION

La proteína microbiana constituye una proporción considerable del flujo duodenal de nitrógeno aminoacídico en los rumiantes y la maximización en su producción es la forma más económica de suplementar proteína al ganado; además, la composición de aminoácidos de la proteína verdadera es similar a la de la proteína de los principales productos animales, destacándose por su alta calidad nutricional (Posada et al. 2005b). La mayor parte de los aminoácidos disponibles en el intestino proceden de la proteína de los microorganismos que se sintetizan en el rumen (Aldrich et al. 1993), sin embargo, esa fuente de nitrógeno no cubre las necesidades de los animales en sus primeras fases de crecimiento (Ørskov, 1982), por lo que las dietas deben ser suplementadas con fuentes de proteína de sobrepaso. La síntesis de proteína microbiana varía debido a la influencia de varios factores relativos a la dieta o al ambiente ruminal, por lo que su cuantificación es un punto crítico en los sistemas de valoración nutritiva, en especial en los animales que presentan mayores niveles de producción (Posada et al. 2005b). La mayoría de los estudios realizados sobre la producción de proteína microbiana ruminal y degradabilidad de la proteína de la dieta se han realizado con una relación elevada de forraje/concentrado, siendo escasa la información en sistemas de producción en donde se utiliza una dieta rica en concentrados, sin embargo la poca información indica que la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana es inferior en dietas altas en concentrados que en aquellas ricas en forraje (AFRC, 1993). En las dietas convencionales el 50 – 70% de los aminoácidos absorbidos en duodeno son de origen microbiano (Van Soest, 1994). La estimación del aporte de proteína de origen microbiano en los rumiantes se ha convertido en una importante área de estudio en la nutrición proteica de estos animales y está siendo incorporada en los sistemas de evaluación nutricional utilizados en muchos países (Chen et al. 1995). Tradicionalmente, el método prevalente para la estimación de la síntesis de proteína microbiana ha sido el muestreo duodenal en animales canulados (Hristov, 2007). El conocimiento de dicho proceso permitirá generar alternativas de alimentación más eficientes y ambientalmente sostenibles.

II. Revisión bibliográfica

1. Anatomía y función ruminal

Los animales rumiantes tienen una capacidad desarrollada en un grupo de estómagos que contienen microorganismos capaces de digerir materiales fibrosos, como la celulosa. Esto permite al animal comer y digerir partes de las plantas, como el pasto, que tiene un alto contenido en fibra y bajo valor nutricional para animales de estómago simple (Dijkstra et al., 2005). El retículo rumen permite a los rumiantes degradar los carbohidratos estructurales (alimentos fibrosos), gracias a la capacidad enzimática de la flora simbiótica que ahí se encuentra. Estos órganos también permiten que el rumiante ingiera alimento durante un periodo corto de tiempo y almacenarlo para masticarlo cuidadosamente mediante la regurgitación selectiva (rumia). El alimento parcialmente digerido con microorganismos ruminales pasará por todo el tracto digestivo siendo atacado por el sistema enzimático del intestino para ser mayormente digerido. Este compartimento de fermentación pregástrica (**Figura 1**), puede dividirse en tres partes: rumen o panza, retículo o redcilla y omaso o librillo; y un estómago secretor, el abomaso o cuajar donde se lleva a cabo la digestión enzimática (Czerkawsky, 1986).

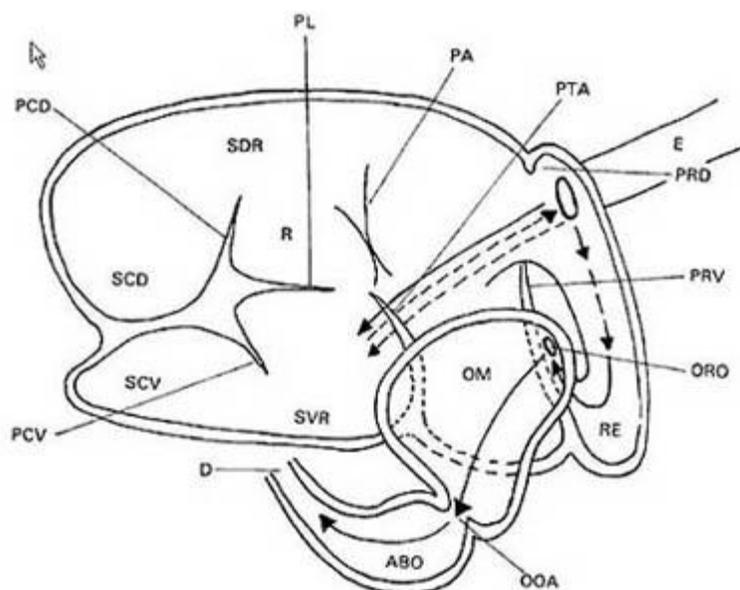


Figura 1. Sección a través del plano vertical mediano de preestómagos de rumiante vista por su lado derecho. ABO. Abomaso; D. duodeno; E. esófago; OM. Omaso; OOA. Orificio omaso-abomasal; ORO. Orificio retículo omasal; PA. Pilar transversal anterior; PCD. Pilar

coronario dorsal; PM pilar coronario ventral; PL. Pilar longitudinal; PRD. Pilar reticular dorsal; PRV. Pilar reticular ventral; PTA. pliegue transversal anterior; R. rumen; RE. Retículo; SCD. Saco ciego dorsal; SCV. Saco ciego ventral; SDR. Saco ruminal dorsal; SVR. Saco ruminal ventral; → dirección del alimento durante ingestión y pasaje; - - → dirección de la digesta durante la rumia.

1.1. Rumen

El rumen en el adulto se desarrolla con la ayuda de la digestión de pastos, las contracciones musculares del rumen-retículo mezclan la ingesta, la saliva y los microorganismos ruminales (Hobson, 1988). El rumen es el preestómago de mayor tamaño siendo un saco ciego con una estructura multilobular formada por dos sacos, dorsal y ventral, dividido por medio de fuertes paquetes musculares o pilares, en distintos sacos ciegos anteriores y posteriores. La superficie interna ruminal se encuentra cubierta de proyecciones queratinizadas (papilas), las cuales contribuyen a la absorción en órgano. Dichas papilas difieren en tamaño y localización entre las especies, generalmente son de forma cónica, de 1 a 3 mm de alto, o foliadas que pueden medir 1 cm de alto en el bovino adulto.

La distribución de las papilas no es uniforme; en la mayoría de los rumiantes son los lados del saco dorsal y el saco ventral los que presentan una mayor densidad y altura de papilas (Czerkawsky, 1986). Los microorganismos ruminales hidrolizan la celulosa, hemicelulosa, pectinas, almidones y otros polisacáridos de las plantas, para obtener varios productos, algunos de los cuales pueden ser sujetos aun más a una acción microbiana.

La saliva esencialmente es un amortiguador bicarbonato-fosfato de pH, y mayores volúmenes secretados proveen un mayor medio acuoso para el rumen y ayudando a los microorganismos a mantener el contenido ruminal cerca de la neutralidad a pesar de los ácidos producidos (Hobson 1988).

1.2. Retículo

El retículo se comunica con el omaso a través del orificio retículo-omasal situado ventralmente al cardias. Se separa del rumen por un pliegue de tejido, llamado rumino-reticular, que se extiende desde el lado ventral derecho hacia la izquierda, cruzando parcialmente de la región dorsal derecha a izquierda. Como consecuencia de esta separación anatómica incompleta y de las similitudes funcionales del retículo y rumen, ambos compartimentos son denominados juntamente como retículo-rumen. La mucosa que cubre el retículo está estructurada en forma de panales de abejas y está cubierta por pequeños repliegues que comprometen el epitelio, la membrana basal y el tejido conectivo subyacente, conocidas como papilas (Czerkawsky, 1986).

1.3. Omaso

Este compartimiento se encuentra hacia el lado derecho del reticulorumen y se comunica con el retículo y abomaso por los orificios retículo-omasal y omaso-abomasal, respectivamente. Es un órgano elipsoide aplanado lateralmente. Su capacidad es de 7 a 18 litros en el bovino. Dentro del omaso se presenta un gran número de láminas que naciendo desde su curvatura mayor se proyectan al piso del órgano dando lugar al canal omasal. Las láminas omasales presentan un gran número de papilas cónicas queratinizadas que se orientan en dirección al abomaso. El papel del omaso no es muy conocido, pero se sabe que en este órgano se absorben agua, amoníaco, AGV'S y electrolitos inorgánicos, y presumiblemente algunos AGV'S y amoníaco son producidos aquí.

1.4. Abomaso

Este compartimiento es el equivalente a los monogástricos en cuanto a la digestión de los nutrientes. Los ácidos y las enzimas que son secretadas en el abomaso, son mezclada con el alimento por medio de la actividad muscular del órgano. Sin embargo considerando que en animales monogástricos este tiene un ritmo circadiano asociado con los patrones de alimentación, en los rumiantes es un ritmo ultradiano el cual es expuesto por la actividad motora del abomaso como consecuencia del pasaje relativamente continuo del retículo-

rumen. La distensión del abomaso inhibe el vacío del retículo-rumen, pero es el estímulo principal para vaciar el abomaso.

1.5. Microorganismos ruminales

Desde el punto de vista evolutivo los rumiantes son considerados como la especie animal de mayor desarrollo en el sistema digestivo. Las adaptaciones anatómicas dieron como resultado la compartimentación del tracto digestivo y de las fermentaciones pre-gástricas desarrolladas, condujeron a una relación simbiótica del animal hospedero y su ecosistema microbiano. El rumen es una de estas adaptaciones altamente especializada del tracto digestivo que facilita el almacenamiento y procesamiento de los diferentes nutrientes consumidos en la dieta de los rumiantes (Asocras, 2000). Los microorganismos ruminales llevan a cabo un complejo proceso de fermentación, esencial para el mantenimiento de la nutrición, y digestión del alimento en el animal hospedero (Fonty et. al.1991), funcionando de manera sinérgica y competitiva debido a su diversidad, adaptándose en simbiosis para poder sobrevivir en condiciones de anaerobiosis, altas diluciones, altas densidades de células y predación protozoaria (Asocras, 2000). La población microbiana ruminal está compuesta por tres grandes grupos: bacterias, protozoarios y hongos.

1.5.1. Bacterias

Las bacterias son los microorganismos más abundantes del ecosistema ruminal, representando el 50% de la masa total del rumen. Se encuentran en una gran variedad de géneros y especies agrupándose de acuerdo a su actividad. La mayoría son anaerobias estrictas, aunque también se encuentran presentes organismos facultativos. Entre sus funciones se encuentran la degradación de la fibra, digestión de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y almidones), producción de aminoácidos, fermentación de azúcares solubles y producción de ácidos grasos volátiles (AGV`S) (Mojica, 1993).

El número de bacterias varía entre 10^{10} y 10^{11} por gramo de líquido ruminal, lo cual representa entre 3 y 8 kg de bacterias en el rumen de un bovino adulto. Las bacterias pueden ser clasificadas de acuerdo al sustrato que utilizan (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de especies bacterianas del rumen de acuerdo al tipo de sustrato que fermentan (Yokoyama et al., 1998)

Principales especies celulolíticas	Principales especies proteolíticas
<i>Fibrobacter succinogenes</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Ruminobacter amylophylus</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Streptococcus bovis</i>
Principales especies hemicelulolíticas	Principales especies productoras de NNH_3
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Ruminococcus spp.</i>	<i>Prevotella ruminicola</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas bovis</i>
Principales especies pectinolíticas	Principales especies ureolíticas
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Lachnospira multiparus</i> <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Treponema bryantii</i>	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Selenomonas spp.</i> <i>Prevotella ruminicola</i> <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Butyrivibrio spp.</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Treponema sp.</i>
Principales especies amilolíticas	Principales especies que utilizan lípidos
<i>Ruminobacter amylophylus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Succinimonas amylolytica</i> <i>Succinimonas amylolytica</i> <i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Treponema bryantii</i> <i>Eubacterium sp.</i> <i>Fusicillus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i>
Principales especies que utilizan azúcar	Principales especies productoras de metano
<i>Treponema bryatii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>

Las bacterias celulolíticas tienden a disminuir al incrementar la disponibilidad de carbohidratos solubles y predominan con dietas ricas en forraje. La actividad celulasa parece ser resultado de un complejo enzimático extracelular con funciones específicas para la degradación escalonada de la celulosa hasta glucosa (Yokoyama et al., 1988).

Las bacterias amilolíticas predominan en dietas ricas en carbohidratos solubles, si bien, ciertas especies amilolíticas degradan la celulosa, pudiendo predominar incluso cuando los animales reciben dietas pobres en carbohidratos no estructurales. La degradación del almidón se realiza mediante la intervención de α -amilasas extracelulares que rompen al azar la cadena del almidón (Yokoyama et al., 1988).

Existen especies bacterianas que preferentemente degradan azúcares simples y carbohidratos de bajo peso molecular liberados durante el proceso de hidrólisis de carbohidratos más complejos como el almidón y la celulosa. Otras especies bacterianas utilizan para su crecimiento los productos que resultan de la primera fermentación, lactato, succinato y metanoato, en una segunda fermentación. El lactato aumenta tras el consumo de cereales y es fermentado hasta acetato, propionato o ácidos grasos de cadena más larga por este tipo de bacterias. El succinato es el producto final de las bacterias ruminales convirtiéndose en propionato y CO₂ y el metano es utilizado como precursor por las bacterias metanogénicas.

Una amplia variedad de especies bacterianas ruminales presentan actividad proteolítica aunque algunas de ellas como *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio* y *Ruminobacter amylophilus* destacan por su intensa actividad. Los aminoácidos y pequeños péptidos pueden ser utilizados directamente por los microorganismos para la construcción de sus propias proteínas, sin embargo, gran parte de ellos son desaminados hasta amoníaco y ácidos carboxílicos por otras especies bacterianas, y en esta forma pueden ser utilizados. En general las bacterias que fermentan carbohidratos complejos van a utilizar amoníaco, mientras que aquellas que fermentan azúcares sencillos utilizan proteína preformada (Russell et al., 1992)

Los triglicéridos y fosfolípidos son hidrolizados hasta ácidos grasos libres, glicerol y galactosa, que debido a la ausencia de O₂ en el medio ruminal los ácidos grasos libres no

pueden ser utilizados como fuente de energía por las bacterias, únicamente se ha descrito su degradación parcial hasta cuerpos cetónicos en el epitelio ruminal donde probablemente la población bacteriana adherente aerobia facultativa sea la responsable de su oxidación (Doré et al, 1991). Las bacterias metanogénicas producen metano a partir de la reducción de CO₂ con H₂ gaseoso regulando de esta manera los procesos de fermentación.

1.5.2. Protozoarios

El número de protozoarios en el rumen es mucho menor que el de las bacterias (10⁵ a 10⁶ por ml), aunque, por su tamaño, los protozoarios pueden representar hasta el 40% del N microbiano total y proporcionar e 60% de los productos de la fermentación microbiana. Los protozoarios del rumen son anaerobios estrictos y pertenecen a dos grupos taxonómicos, holotricos y entodiniomorfos (**Cuadro 2**), estos últimos presentan una mayor variedad de especies. Los holotricos, se presentan en su totalidad cubiertos por finos cilios, son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles. Los entodiniomorfos son más específicos en sus requerimientos nutricionales y morfológicamente presentan mayor complejidad (Orpin, 1984).

Cuadro 2. Clasificación por especies de protozoarios ruminales con los sustratos preferentemente fermentados (Van Soest, 1994)

Genero	Especie	Substrato fermentado
Holotricos	<i>Isotricha</i>	Almidón y azures
	<i>Dasytricha</i>	Almidón y azucares
Entodiniomorfos	Entodinia	Almidón
	Epidinium	Almidón y hemicelulosa
	Ophryoscolex	Almidón
	Diplodinium	Celulosa
	Eudiplodinium	Celulosa
	polyplastron	Celulosa

Los protozoarios ingieren partículas de alimentos así como bacterias vivas que probablemente mantengan su actividad tras su fagocitación, también pueden fermentar diversos tipos de carbohidratos incluyendo celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azucares solubles, produciendo AGVs y H₂. El H₂ es utilizado por las bacterias metanogénicas adheridas a la superficie del protozoario para producir metano (Van Soest, 1994). Contribuyen a la degradación ruminal de la fibra y su presencia estimula la celulólisis bacteriana (Demeyer, 1981; Orpin, 1984). Dicha estimulación está relacionada con la utilización del ácido láctico que deprime la degradación de la fibra. La habilidad de los protozoarios para fagocitar almidón y azucares solubles evita su rápida degradación y previene de estados de acidosis ruminal cuando se consumen elevados niveles de cereales (Williams et al., 1986). No obstante cuando los protozoarios ingieren grandes cantidades de almidón o carbohidratos solubles sufren un proceso de lisis celular que explica la pérdida de la población de protozoarios con raciones con un elevado nivel de carbohidratos no estructurales, debido a que el nivel del pH disminuye. Sin embargo en estos fenómenos existe una gran variación individual, así en dietas con altos niveles de concentrado, en algunos individuos puede no causar muerte de protozoarios (Franzolin et al., 1996). Los

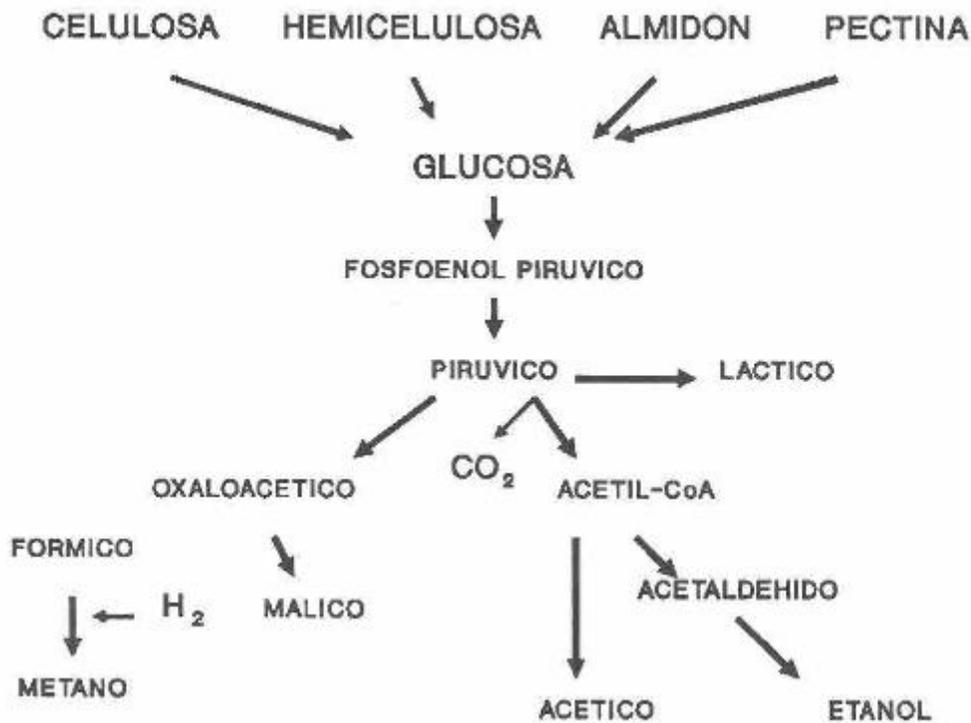
protozoarios poseen actividad proteolítica, aminopeptidasa y desaminasa, carecen de actividad ureasa y el amoníaco es una mala fuente de N para su crecimiento (Williams et al., 1986).

1.5.3. Hongos

Estos microorganismos se encuentran irregularmente distribuidos bien en la fracción líquida o, adherida al material sólido y paredes ruminales lo que hace posible su permanencia en el rumen a pesar de su largo tiempo de generación (Van Soest, 1994). Su distribución solo se limita al tracto digestivo de los herbívoros, ya que están altamente relacionados con dietas fibrosas teniendo una distribución geográfica muy amplia (Bauchop, 1981; Orpin et al., 1988). La digestión de los componentes fibrosos de las plantas por parte de los hongos anaeróbicos ha sido claramente demostrada en numerosos experimentos *in vitro* (Akin, 1983; Akin et al., 1987; Akin et al., 1988; Bauchop, 1979a; Bauchop, 1979b; Bauchop, 1981; Demeyer, 1981; Gordon et al., 1985; Orpin et al., 1980; Theodorou et al., 1989). Los hongos ruminales han demostrado poseer gran cantidad de enzimas encargadas de degradar los principales carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) de las paredes celulares de las plantas (Barichievichet al., 1990; Gordon et al., 1989; Hebraud et al., 1988; Kopeóny et al., 1988; Lowe et al., 1987; Orpin et al., 1988; Williams et al., 1987).

En la fermentación de la celulosa (*in vitro*) por los hongos anaeróbicos se han detectado los siguientes productos finales: acetato, lactato, formato, etanol, CO₂ y H₂. Para todos los carbohidratos que soportan el crecimiento de los hongos, los productos finales más abundantes fueron acetato y lactato con pequeñas cantidades de hidrógeno, dióxido de carbono y Piruvato (**Figura 2**) (Orpin, 1978; Orpin et al., 1988). Existen diferencias entre las diversas cepas de hongos anaeróbicos en cuanto a la utilización de los distintos substratos. En términos generales, muchas de las especies de estos hongos son capaces de usar como fuentes de carbono los carbohidratos solubles glucosa, celobiosa, xilosa, maltosa y sucrosa (Orpin, 1975; Orpin, 1976; Orpin, 1977; Orpin, 1978; Orpin et al., 1979; Theodorou et al. 1988).

Figura 2. Metabolismo de los carbohidratos de los hongos.



(Adaptado de Orpin et al., 1986)

Sin embargo, a pesar de la gran capacidad de estos hongos para degradar los componentes estructurales de las paredes de las plantas, el mayor porcentaje de esta degradación es aún asignada al grupo de las bacterias (Theodorou et al., 1988; Whindham et al., 1984). Destacándose que para poder cuantificar el papel de estos hongos in vivo, es necesario hacer una buena estimación de su biomasa (Bauchop, 1979a; Fonty et al., 1988; Orpin, 1988; Theodorou et al., 1988). Aunque por otro lado, Whindham et al. (1984) han concluido que el desarrollo de gran número de esporangios sobre la fibra puede no ser indicativo de un substancial rol en la degradación de la fibra. Sin embargo, las investigaciones señalan que las dietas más fibrosas soportan las más grandes poblaciones de estos hongos (Bauchop, 1981). Igualmente, se ha observado que las poblaciones de los hongos del rumen tienden a disminuir en las dietas ricas en almidón (Grenet et al., 1988).

Orpin et al. (1988) han sugerido que los hongos del rumen pueden ser importantes para la función ruminal cuando la dieta consiste de forrajes de pobre calidad.

Si bien no hay evidencia de que los hongos anaeróbicos pueden utilizar lignina como fuente de carbono, estos hongos fueron capaces de disolver hasta un 16% de la lignina de la paja y heno de trigo (*in vitro*) (Orpin, 1984; Gordon, 1985). Estos hongos también fueron capaces de degradar y debilitar substancialmente los tejidos lignificados de forrajes fertilizados con azufre (Akin et al., 1987). Particularmente, el *N. frontalis* produce grandes cantidades de celulosas activas, cuya producción fue significativamente incrementada en cultivos mixtos con bacterias metanogénicas (Mountfort et al., 1985; Wood et al., 1986). Adicionalmente, la degradación de la celulosa por los hongos en presencia de bacterias metanogénicas fue mucho más rápida que cualquier dato reportado previamente (Mountfort et al., 1982; Richardson et al., 1986). De igual forma, la actividad sinérgica de los hongos anaeróbicos del rumen sobre degradación de la celulosa fue considerable en cultivos mixtos con las bacterias *Veillonella alcalescens* y *Megasphaera elsdenii* que utilizan lactato, y en cultivos con *Fibrobacter succinogenes* (Richardson et al. 1986).

1.6. Interacciones ruminales

Las poblaciones microbianas descritas anteriormente interactúan en el ecosistema ruminal para maximizar la eficiencia de fermentación del alimento (Van Soest, 1982). Desde el punto de vista de la nutrición microbiana, pueden establecerse dos grupos de microorganismos: los que fermentan los alimentos y los que fermentan los productos de fermentación producidos por los primeros. Esta segunda población tiene una función básica eliminando los productos finales de la fermentación del primer grupo y proporcionándoles factores esenciales para su crecimiento. Es por eso que en cultivos puros se descubren muchos productos finales que no se detectan en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Un ejemplo de estas relaciones son los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGVR) que son producidos por las especies amilolíticas y son esenciales para las celulolíticas para la síntesis de aminoácidos o para la producción de ácidos de cadena larga.

1.6.1. Interacción entre los microorganismos ruminales y el hospedador

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje, esta característica se basa en la posibilidad para degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como la celulosa, hemicelulosa y pectina, que son poco digestibles en monogástricos. La mayor degradación de este alimento es por digestión fermentativa y no por acción de las enzimas digestivas, y la digestión fermentativa es realizada por los diferentes tipos de microorganismos que aloja el rumiante en sus divertículos estomacales. Por esta razón se debe tener presente, que al alimentar a los rumiantes, primero estamos alimentando a los microorganismos ruminales, por lo cual se está formando una simbiosis entre el animal y el hospedador (Van Soest, 1994).

1.6.2. Aporte de sustratos fermentables

El avance sobre el conocimiento en los procesos digestivos y rutas metabólicas que conducen a la síntesis de los productos animales permite ajustar los aportes proteicos en las raciones de forma que se evite el exceso de nitrógeno en las dietas y ser eliminado por vía urinaria y fecal evitando así una contaminación ambiental. Todo alimento (forraje o concentrado) está constituido por distintas fracciones: carbohidratos (almidón), proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y agua. De los componentes mencionados se describirán a continuación los dos primeros, ya que de la digestión y metabolización de ellos dependerá la futura producción del animal.

1.6.2.1. Almidón

Es el principal constituyente del endospermo de los granos, variando su proporción de acuerdo al tipo de grano y a otros factores intrínsecos de la planta. Está formado por dos tipos de polímeros, amilosa y amilopectina. La primera constituye un 20-30 % del almidón de los cereales, caracterizándose por tener una estructura amorfa, sin restricciones al paso del agua y a la amilasa. Es un polímero lineal de D-Glucosa con enlaces glucosídicos alfa 1-4. Mientras que la amilopectina, constituye el 70-80 % del almidón de los granos, es un polímero ramificado, con cadenas lineales de unos 20-25 residuos de D-Glucosa en uniones alfa 1-4 y puntos de ramificación con enlaces alfa 1-6. Representa la porción cristalina resistente al paso del agua y al ataque enzimático. El almidón puede ser degradado tanto a nivel ruminal transformándolo en AGV o en el intestino delgado por acción de las enzimas

del animal, siendo el producto absorbido, glucosa. El sitio de digestión del almidón varía en función del tipo de almidón, proporción en la dieta, nivel de consumo, edad del animal, etc. (Armstrong et al., 1979).

1.6.2.2. Proteína

Los compuestos nitrogenados presentes en los alimentos (proteína verdadera y compuestos nitrogenados no proteicos), son utilizados por los microorganismos del rumen para la síntesis de compuestos nitrogenados microbianos, principalmente proteína. Las células microbianas (mayoritariamente bacterias y protozoos) son arrastradas junto a partículas alimenticias no fermentadas y células epiteliales descamadas hacia las porciones posteriores del tramo digestivo donde ocurre digestión enzimática y absorción de los diferentes nutrientes. El conjunto de aminoácidos disponibles para su absorción en intestino constituye la denominada proteína "metabolizable" o "absorbible" que puede ser realmente utilizada por el organismo.

La proteína es degradada hasta amoníaco, el cual puede, en función del aporte de otros nutrientes, ser utilizado en ese momento para la síntesis de proteína o bien ser absorbido por las paredes ruminales y transformado hasta urea en el hígado. El rumiante es capaz de reciclar está urea plasmática a nivel ruminal en periodos posteriores en los que los microorganismos disponen de energía suficiente a través de la saliva o de las paredes ruminales. La urea es devuelta al rumen a través de la saliva o por difusión plasmática a través de sus paredes. Este reciclaje de la urea a nivel ruminal favorece su detoxificación y asegura un aporte constante de proteína degradable al rumen, especialmente cuando los animales reciben dietas bajas en N (Kenedy et al., 1980).

1.6.3. Rumia y movimientos ruminales

La rumia es un reflejo de tipo vagal gobernado por centros gástricos del bulbo y por las áreas hipotalámicas anterior y ventral. Los estímulos que desencadenan la rumia nacen en zonas reflexógenas ubicadas en e retículo-rumen, especialmente en el esfínter esofágico inferior, pliegue retículo-ruminal y en el complejo formado por el pilar craneal y caudal del rumen. Estas zonas captan la textura del aliento por el roce de éste contra las zonas

reflexógenas, su consistencia y el grado de distensión del retículo-rumen. El principal estimulante de la rumia es la propia estructura física del forraje, la cual depende del contenido de fibra de la dieta (estructura de los vegetales, que necesitan ser triturados para facilitar el ataque microbiano). Otro factor que favorece la rumia es el reposo psicosensoorial, los periodos de descanso y oscuridad, así como el hecho de que el animal este acostado y la somnolencia (Church, 1988; Czerkawsky, 1986).

1.6.4. Mantenimiento de pH

Los hidratos de carbono (H_2OC) representan el componente más abundante en la dieta de los rumiantes. El tipo de H_2OC predominante en la dieta condiciona el desarrollo del tipo de flora adecuada para su fermentación y el ajuste de pH a su rango ideal. Así, una ración rica en almidón es fermentada por una flora amilolítica que desarrolla mejor a un pH de 5.5 a 6.0, mientras que una ración compuesta por forraje con alto contenido de H_2OC estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) será fermentada por una flora celulolítica que desarrolla mejor a un pH de 6 a 6.9. Para poder adecuar el pH del rumen a la dieta, el rumiante pone en juego 3 factores que modifican el pH ruminal, los cuales son:

1.6.4.1. Saliva

Un bovino adulto produce por día entre 100 y 180 litros de saliva. Su influencia como factor alcalinizante depende de su producción, la cual a su vez depende fundamentalmente de las horas de rumia, el cual varía de 0 a 10 horas por día, dependiendo en relación directa de la cantidad de forraje grosero en la dieta. Cuando mayor es la cantidad de H_2OC estructurales mayor es el tiempo de rumia, pero esa fibra debe de tener el tamaño adecuado para estimular la rumia (Bauman et al.1985)

1.6.4.2. Producción de AGV'S

Por su carácter ácido cuanto mayor es la producción de ácidos grasos volátiles (AGV'S) más bajo es el pH resultante, su producción es especialmente alta en dietas ricas en concentrados energéticos como los granos, y menor en aquellas ricas en forrajes maduros. La proteína de la dieta también puede contribuir a la producción de AGV'S, especialmente en aquellas raciones con un contenido proteico elevado. Su participación es a través de la

degradación de los aminoácidos hasta metabolitos capaces de convertirse en AGV'S, sin embargo, se carece de datos cuantitativos al respecto (Forrest, 1971).

1.6.4.3. Absorción de AGV'S

Los AGV'S que se liberan en el rumen son aprovechados en parte por las bacterias, que los utilizan para sintetizar algunos de sus componentes estructurales (Wegner et al. 1963; Tweedie et al. 1966), el resto es absorbido en su mayoría a través de la pared del rumen, realizándose por medio de difusión simple, es decir, siempre que el gradiente de concentración sea favorable para ello (Stevens, 1970), aquellos que no son absorbidos a este nivel pasan al omaso y abomaso en donde también hay absorción. Weston et al. (1968), Comprobaron que cercadel76%de los ácidos presentes en el rumen se absorbían a este nivel, 19% en omaso y abomaso y tan solo un 4-5% llegaban a pasar a intestino.

1.6.5. Eliminación de productos finales de la fermentación

Los AGV'S producidos son eliminados con el contenido ruminal o por la absorción directa a través de las paredes del rumen. El ritmo de salida del líquido ruminal, como diluyente, vendrá determinado por el ritmo de renovación del líquido, agua fundamentalmente, y que depende del volumen de agua ingerida, la saliva y la propia difusión de agua desde el plasma sanguíneo. No obstante, la absorción a través de las paredes ruminales constituye la principal vía de eliminación de AGV'S. Se calcula que entre un 10 y 20% pasan a tramos posteriores del intestino (Weston et al., 1968). El CO₂ y el metano son mayoritariamente eliminados por medio del eructo. Ambos compuestos en forma gaseosa forman burbujas diminutas, engrosándose paulatinamente hasta ser eliminadas a través del orificio retículo ruminal y del cardias mediante contracciones del rumen.

2. Degradación de los nutrientes en el rumen

El proceso de fermentación anaeróbica en el rumen convierte los sustratos (principalmente carbohidratos y proteínas) en proteína microbiana y otros productos finales de la fermentación (ácidos grasos volátiles CO₂, péptidos, aa, etc.) los cuales son metabolizados por el rumiante.

2.1. Degradación de los carbohidratos

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales (Hungate, 1966) y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. Además de aportar energía a los microorganismos y al rumiante, se encargan de mantener el óptimo funcionamiento del rumen. Desde el punto de vista nutricional, más enfocado a la biodegradación, se pueden clasificar en fibrosos (corresponden a la fibra neutro detergente [FND] de Van Soest, 1982) y no fibrosos (**Cuadro 3**)

Cuadro 3. Clasificación de los carbohidratos (Adaptado de Van Soest, 1982).

Carbohidratos	Composición
No fibrosos	
Azúcares solubles	Mono y di-sacáridos
Carbohidratos de reserva	
Almidón	Polímero de glucosa unidas por enlaces α 1-4, α 1-6
Fructosanos	Polímeros de fructosa
Levanos	Enlaces β 2-6 (forrajes verdes y granos de cereal)
Inulinas	Enlaces β 2-1 (tuberculos)
Pectinas	Ácido galacturónico, arabinosa, galactosa
Ácidos orgánicos	Productos de fermentación de otros carbohidratos
Fibrosos	
Celulosa	Polímero de glucosa unidas por enlaces β 1-4
Hemicelulosa	Xilanos, glucosa arabinosa, manosa galactosa, ácido galacturónico
Lignina	Polímero fenólico unidos por enlaces cruzados muy complejos

El grado y velocidad de degradación de los carbohidratos en el rumen (**Figura 3**) varía según el tipo y estructuras de los mismos (McAllister et al. 1990, 1993, 1994; Varga et al. 1997) y según la población microbiana predominante (Hespell et al. 1979; Sniffen et al. 1983). El tipo de carbohidrato en la dieta condiciona la proliferación y actividad fermentativa de los microorganismos (Sniffen et al. 1983). Si la dieta ofrecida contiene una mayor proporción de carbohidratos estructurales (forrajes), las bacterias que predominan

son las celulolíticas, las cuales se encargan de degradar la celulosa, hemicelulosa y pectinas principalmente (Van Soest, 1994; Weimer et al. 1999).

Por el contrario, si la dieta incluye grandes cantidades de carbohidratos no estructurales (azúcares, almidones o carbohidratos rápidamente fermentables) proliferan los microorganismos con elevada actividad amilolítica (Theodorou et al. 1993). Los cereales constituyen la principal fuente de carbohidratos no estructurales, así mismo, existen diferencias importantes según el tipo de cereal y al método de procesamiento al cual son sometidos en el patrón de degradación ruminal, ritmo de degradación (Nocek et al. 1991; Nozière et al. 1997; Archimede et al. 1997). La adhesión y colonización de las partículas del grano, sucede igual que lo hacen las bacterias celulolíticas, el primer paso de la digestión de almidones es por parte de las bacterias amilolíticas (McAllister et al. 1990, 1993). Estas bacterias se caracterizan por tener un crecimiento rápido, así como la afinidad por los sustratos y tolerancia a niveles de pH por debajo de 6.0 (Russell, 1991). Cuando los carbohidratos (estructurales y no estructurales) se exponen al ataque microbiano, en primer lugar, experimentan una fase de hidrólisis que los degrada hasta hexosas y pentosas (**Figura 3**). Posteriormente, sigue una fase fermentativa (vía Piruvato) hasta la formación de los ácidos grasos volátiles (AGV'S), principalmente acetato, propionato y butirato. Dichas fases se llevan principalmente por la acción de las enzimas bacterianas y protozoarios, principalmente intracelulares (Russell et al. 1993). Los ácidos grasos volátiles son los principales productos finales de la fermentación de los carbohidratos en el rumen, así como también la principal fuente de energía utilizada por los rumiantes, y su concentración y proporciones son consecuencia de la composición de la dieta y la población microbiana que los degrada (Nocek et al. 1991; Beever, 1993; France et al. 1993; Van Hourtert, 1993).

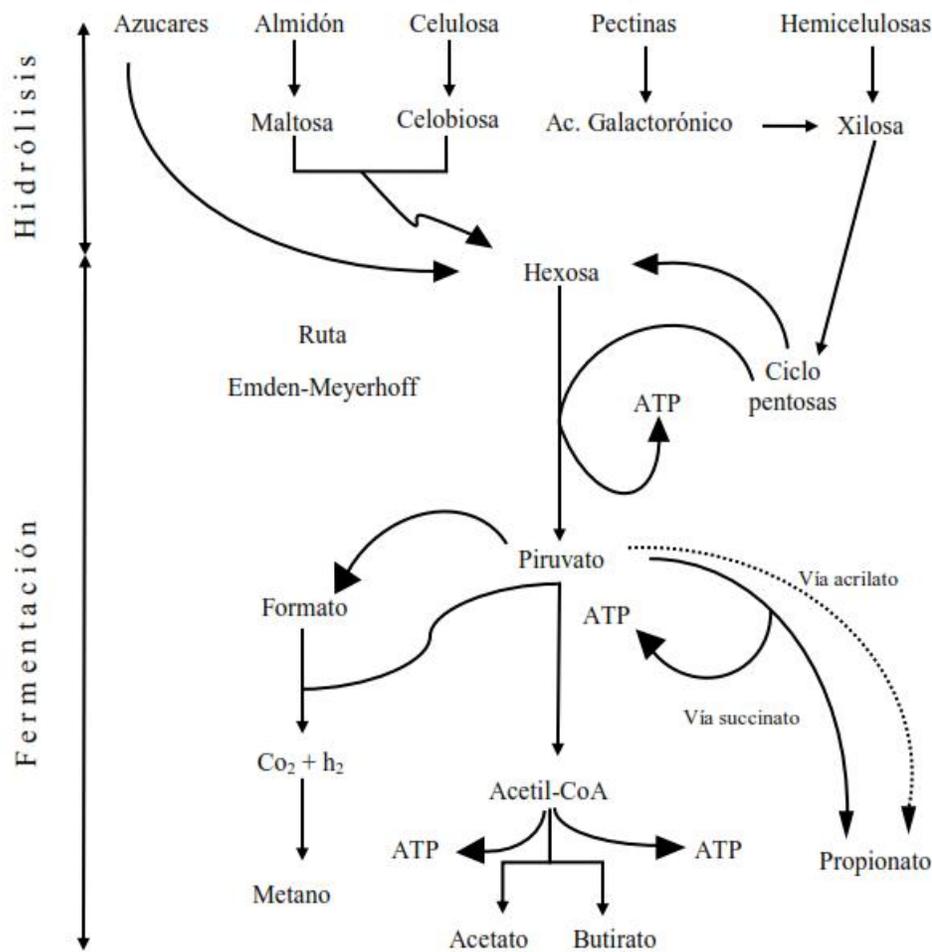


Figura 3. Rutas metabólicas de los carbohidratos en el rumen (Adaptado de France et al. 1993; Jouany et al. 1995)

La degradabilidad ruminal de la proteína de los alimentos es un factor importante que afecta al aporte de aminoácidos al intestino delgado. La velocidad y la cantidad total de proteína degradada en el rumen, puede condicionar la cantidad de proteína bacteriana sintetizada en el rumen y determinar la cantidad total de proteína alimenticia no degradada que llega al duodeno. La cantidad de proteína degradada en el rumen depende en gran medida de la actividad proteolítica de las bacterias ruminales, el acceso de las bacterias a la proteína y el tiempo de retención de las partículas alimenticias en el rumen (NRC, 1985). Hoover et al. (1991) revisaron varios trabajos *in vivo* e *in vitro* que demuestran que existe una correlación fuerte entre el nivel de proteína degradable en la dieta y la eficacia de

síntesis de proteína microbiana. La eficacia máxima de síntesis de proteína microbiana y el mayor aporte de proteína bacteriana al duodeno se alcanza en dietas que contienen entre el 10 y el 13 % de proteína degradable en la ración. Aunque la proteína de origen microbiano es la fuente de aminoácidos más importante para un rumiante, parte de la proteína de la dieta no llega a ser degradada en el rumen y contribuye de forma significativa al flujo de aminoácidos al duodeno, pudiendo alterar la proporción relativa de aminoácidos absorbidos y su valor biológico.

2.2. Degradación de la proteína

Las bacterias ruminales son las principales responsables de la degradación de la fracción soluble de la proteína y probablemente de la proteína en general (**Figura 4**). Su principal actividad proteolítica es del tipo cisteína proteasa, tanto en dietas en concentraciones altas en forraje o concentrado (McAllister et al. 1993; Wallace, 1991). Aunque también intervienen los protozoarios (Ørskov, 1982) y los hongos anaerobios del rumen (Wallace et al., 1998) cuya ausencia provoca una disminución significativa en la proteólisis (Broderick et al., 1991).

En general, la actividad proteolítica de las bacterias es débil, y es la acción conjunta y sinergia de todas estas especies de baja actividad que hace que la proteólisis se realice eficientemente en el rumen (Wallace, 1991). Entre el 30 y 50% de las bacterias ruminales tienen actividad proteolítica, exceptuando las principales bacterias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, y *Fibrobacter succinogenes*) (Hungate, 1966; Wallace et al 1998), pero muy pocas son bacterias proteolíticas (Hungate, 1966). Las especies proteolíticas más importantes, ante diferentes condiciones de alimentación, son, *Ruminobacter amilophylus*, *Prevotella ruminicola*, *Butirivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis* (Yokohama et al. 1998). La degradación de la proteína en el rumen en función de la actividad proteolítica de la flora microbiana, las enzimas proteolíticas se encuentran periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butirivibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace et al. 1998; McAllan et al., 1983). Para degradar la proteína insoluble, las bacterias deben adherirse al sustrato, por lo que tendrán rápido acceso a los productos de degradación (Owens et al. 1988).

Ruminobacter amilophylus además de tener actividad proteasa también tiene actividad amilolítica, por lo que es de particular importancia en dietas ricas en almidón. Su función proteolítica se basa en degradar las proteínas estructurales dentro del grano del cereal, exponiendo el almidón para su degradación, sin ser capaz de utilizar los péptidos y aminoácidos formados. *Butirivibrio fibrisolvens* puede ser la bacteria proteolítica predominante en determinados animales, y aumenta su importancia cuando la dieta es rica en proteína poco degradable. Puede incorporar péptidos y aminoácidos preformados directamente a su síntesis de proteica que actúan como estimuladores de la misma.. Tal vez el tipo más abundante de bacterias en todo tipo de dietas sea *Prevotella ruminicola*, que tiene varias actividades proteolíticas, y aunque puede incorporar péptidos de un determinado tamaño a su síntesis proteica, es incapaz de utilizar aminoácidos libres (Cotta et al. 1986).

La actividad proteolítica de los protozoarios es diez veces menor que la bacteriana, en condiciones de pH 6 – 7. Su principal actividad es de cisteína proteasa u tienen mayor actividad aminopeptidasa y de tripsina de las bacterias (Forsberg et al. 1984). Su actividad proteasa es intracelular, por lo que su principal substrato serán proteínas asociadas a un determinado tamaño de partícula que puedan ser ingeridas fácilmente, como las bacterias y cloroplastos, y prácticamente no intervienen en la degradación de proteínas solubles. Al ser las bacterias su principal fuente de proteína, los protozoarios determinan el reciclaje de N ruminal (Wallace et al. 1987). Los hongos como *Neocallimastix frontalis*, tienen alta actividad proteolítica extracelular del tipo metaloproteasa (Wallace, 1991). Desarrollan su actividad en las partículas vegetales en las que se asocian establemente en el proceso de degradación de la pared celular (Wallace et al. 1998).

La proteína que entra al retículo rumen tiene la posibilidad de ser degradada por bacterias y protozoarios, la cual involucra dos pasos: hidrólisis de la cadena péptida (proteólisis) para producir péptidos y aminoácidos, y la desaminación de los aminoácidos. Después de la proteólisis, los péptidos o aminoácidos liberados pueden dejar el rumen y ser utilizados para el crecimiento bacteriano, o pueden ser degradados en amoníaco y aminoácidos libres. Los aminoácidos son rápidamente degradados en rumen, por lo que

muy pocos de ellos están disponibles para la absorción o su paso a través del retículo-rumen (Villalobos et al., 2000).

La conversión del nitrógeno de la dieta en amoníaco y nitrógeno microbiano es importante ya que el rumiante utiliza todo el nitrógeno existente en la dieta. Bajo ciertas condiciones, las cantidades considerables de nitrógeno en la ración pueden ser degradadas a amoníaco e incorporarse en la proteína microbiana (Crawford et al.1980). La proteína rápidamente degradable en el líquido ruminal representa la fracción proteica rápidamente fermentable y nitrógeno no proteico (Beever et al., 1994).la degradación de la proteína en el rumen influye en el pH y la concentración de nitrógeno amoniacal en el líquido ruminal. Estas variaciones modifican el ambiente ruminal, propiciando cambios en la capacidad de degradación de la proteína dietaría (NRC,1996).

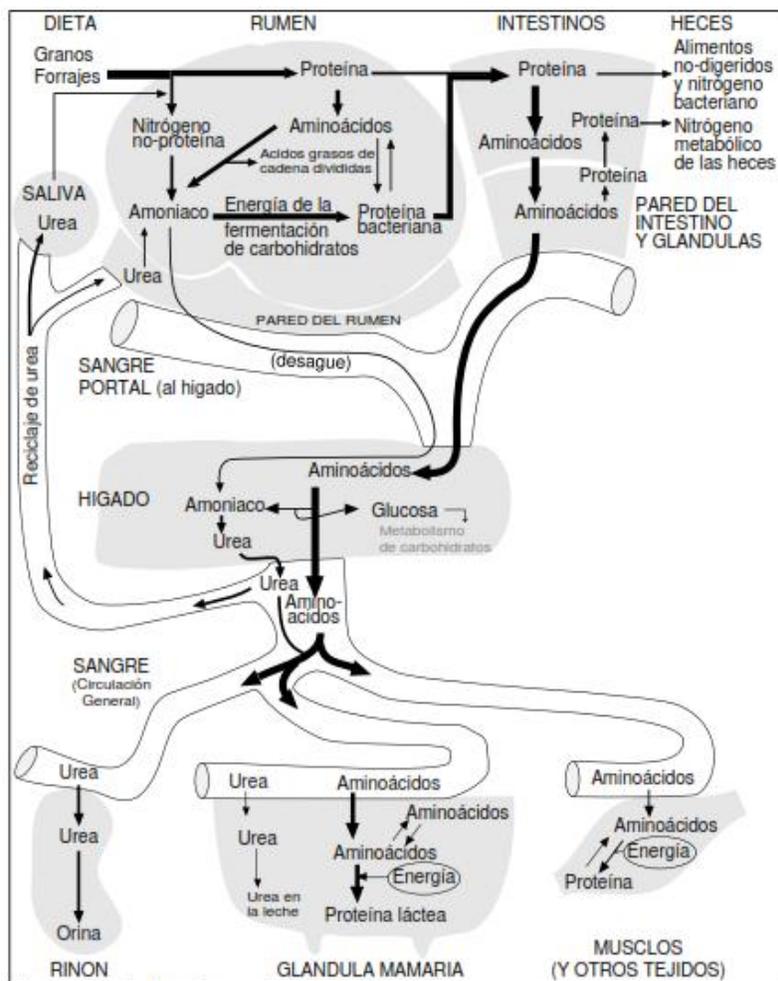


Figura 4. Metabolismo de las proteínas en el rumen.

2.3. Degradación de péptidos

Las cadenas de polipéptidos resultantes de la hidrólisis de las proteínas, son degradadas por la acción de las peptidasas microbianas hasta péptidos más pequeños y finalmente hasta aminoácidos. La peptidolisis es mayoritariamente bacteriana, asociada a la membrana celular, por lo que los oligopéptidos formados podrán ser utilizados por la misma bacteria o pasar al medio ruminal y ser utilizado por otras especies bacterianas que no tienen esta actividad. También se han descrito bacterias que secretan peptidasas extracelularmente, liberando todos los productos de degradación al medio. Posiblemente la acción de estas exopeptidasas sea acceder a otros sustratos como el almidón que pueden estar protegidos por una matriz proteica (Cotta et al. 1986). Otras especies degradan los péptidos pequeños intracelularmente y utilizan los productos de degradación para su propia síntesis proteica o bien la secretan extracelularmente (Nolan, 1993).

Los péptidos más pequeños y los aminoácidos entran al interior celular para ser degradados hasta amoniaco o para ser incorporados directamente a la síntesis proteica. La mayoría de las bacterias prefieren los péptidos que los aminoácidos libres, posiblemente porque los péptidos son transportados más eficientemente a través de la membrana celular. La eficiencia es inversamente proporcional a la longitud de su cadena y también porque los transportadores de los péptidos deben ser específicos que los de los aminoácidos (Payne, 1983; Wallace et al. 1998). El ritmo de captación de péptidos parece ser el punto limitante en la degradación proteica, siendo la secuencia de la cadena de aminoácidos la característica más importante (Chen et al., 1987).

2.4. Degradación de los aminoácidos.

Las proteínas son compuestos orgánicos conformados por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que intervienen en diversas funciones vitales esenciales, como el metabolismo, la contracción muscular o la respuesta inmunológica (Russell et al. 1992). Los animales no metabolizan las proteínas como tales; sino los aminoácidos que las componen, para sintetizar sus propias proteínas. La mayoría de los aminoácidos que ingiere el animal vienen en forma de proteínas que solo pueden incorporarse a las diferentes rutas

metabólicas. La mayoría de los aminoácidos se producen intracelularmente tras la degradación de péptidos pequeños, por lo que su nivel en el líquido ruminales muy bajo, a excepción de una hora después de comer que su concentración puede aumentar (Wallace et al 1998). Los aminoácidos libres presentes en el líquido ruminal proceden mayormente de la lisis de los microorganismos y de la síntesis microbiana (Nolan, 1993). La alanina se sintetiza al haber un exceso de amoniaco y actúa como reserva de nitrógeno y piruvato (Erfle et al. 1977). Los aminoácidos se pueden metabolizar mediante descarboxilación, transaminación o desaminación no oxidativa. Esta última es la más común, seguida de la descarboxilación de los cetoácidos, para la producción de AGV'S, dióxido de carbono y amoniaco. En condiciones normales, la descarboxilación de los aminoácidos para formar aminas es poco importante, pero puede cobrar importancia en condiciones de pH ácido (Tamminga, 1979). La velocidad de desaminación de los aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, hasta amoniaco es rápida, por lo que vendrá limitada por la velocidad de captación de péptidos y aminoácidos por los microorganismos (Hino et al. 1985).

Durante la desaminación no oxidativa y descarboxilación de los cetoácidos, se produce muy poca energía, por lo que no es el principal producto de reacción (Cotta et al. 1986). Es mucho más importante la producción de amoniaco, ya que es la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana y la producción de GVR (isovalerato, 2 – metilbutirato e isobutirato, formados a partir de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina respectivamente). Los AGVR son esenciales para la síntesis de aminoácidos ramificados y ora el crecimiento de las especies celulolíticas. En los protozoarios ciliados, los aminoácidos resultantes de la proteólisis intracelular podrán ser excretados al exterior, incorporados a su síntesis proteica, o bien desaminados en un proceso similar al bacteriano (Wallace et al. 1998). La mayoría de los protozoarios tienen actividad desaminasa 3 veces más alta que la bacteriana (Forsberg et al. 1984; Hino et al. 1985; Cotta et al. 1986). Por esta razón y porque pueden llegar a representar un lato porcentaje de la biomasa ruminal, en la defaunación se reducen los niveles de amoniaco (Wallace et al. 1998)

2.5. Degradación del nitrógeno no proteico

Los microorganismos del rumen se caracterizan por su gran capacidad para sintetizar todos los aminoácidos, incluyendo los esenciales, necesarios para el animal. Por lo tanto los rumiantes son menos dependientes de la calidad de la proteína ingerida. Una parte del nitrógeno de los alimentos para los rumiantes puede administrarse, en reemplazo de las proteínas, en forma de compuestos nitrogenados sencillos como los compuestos de nitrógeno no proteico, como la Urea y las sales de amonio. (Stock et al. 1981). El nitrógeno no proteico puede entrar en el rumen, de forma exógena (amoníaco, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, péptidos de cadena corta, urea, aminos o amidas) a través del alimento, o por reciclaje de la urea endógena. Los alimentos más ricos, en compuestos nitrogenados no proteicos son los forrajes, especialmente los conservados y la cantidad presente dependerá de una serie de factores como la edad, variedad y especie, fertilización, temperatura, intensidad de luz, fotoperiodo y disponibilidad de agua (Hegarty et al. 1973). Como producto de la descomposición de las proteínas verdaderas del alimento (forrajes frescos, conservados y suplementos) y de las sustancias ricas en nitrógeno no proteico generan, al descomponerse en el rumen, amoníaco. Esta sustancia, junto a cadenas carbonadas, que provienen de la descomposición de los azúcares solubles y del almidón de los alimentos, generan en el rumen energía, indispensables para la síntesis de proteínas microbianas, o directamente la combinación de amoníaco y de la energía facilitan la multiplicación de las bacterias o microorganismos en el rumen que serán los responsables de atacar a la fibra, azúcares y almidones de los alimentos (Russell et al. 1992).

2.5.1. Urea

Es la fuente de nitrógeno sólido más barata, es un polvo blanco soluble en agua que se utiliza como fertilizante y para la nutrición animal. Se presenta en el mercado en forma granulada y perlada, siendo esta última la más recomendable para la alimentación animal por su soltura y facilidad para ser mezclada con otros ingredientes. La urea es rápidamente degradada a amoníaco por la acción de la ureasa. Esta enzima es principalmente de origen bacteriano y está presente en dos tipos de poblaciones, una población de bacterias anaeróbicas estrictas asociadas a la fase líquida que degradarán principalmente la urea de la dieta y la saliva; la otra población es un grupo de bacterias anaerobias facultativas con

actividad ureasa específica, localizadas en la pared ruminal y que degradan principalmente la urea que llega a través del epitelio ruminal (Wallace et al. 1998). La urea endógena puede entrar vía saliva o por vía pasiva a través del epitelio ruminal. Aproximadamente el 85% de la urea en el rumen lo hace por difusión pasiva y depende de la concentración de la urea plasmática y del amoníaco ruminal. El reciclaje por vía salival, dependerá de la secreción de saliva, siendo mayor en dietas con forraje grosero, sin correlacionarse con la concentración de urea sanguínea (Ørskov, 1992).

Esta segunda población juega un papel importante en el reciclaje endógeno. Su intensa actividad ureolítica favorece un gradiente de urea negativo en las proximidades de la pared y favorece la entrada de urea por difusión pasiva. Su actividad ureasa es controlada por los niveles de urea y amoníaco ruminales. El amoníaco inhibe la actividad ureasa y la urea la estimula. Por tanto, cuando la concentración de amoníaco es baja, aumenta el reciclaje (Cheng et al. 1980; Czerkowsky et al. 1982; Wallace et al. 1998). Estos mecanismos de autoregulación a través de la actividad ureasa, de la permeabilidad de las paredes ruminales y del reciclaje endógeno, ayudan a evitar aumentos en la concentración de amoníaco, producido rápidamente después de la ingestión de grandes cantidades de urea, que pueda llegar a ser tóxico.

2.5.2. Nitrógeno de la dieta

Los componentes principales de N dietario de los rumiantes lo constituyen las proteínas y formas de NNP tales como ácidos nucleicos y urea. En las dietas alimenticias tradicionales, la proteína verdadera constituye el principal componente del contenido nitrogenado, en los forrajes verdes constituye el 60 - 80% de N total, y es aún mayor el caso de los concentrados proteicos (Ørskov, 1982). El nitrógeno no proteico (NNP) representa entre el 15 - 25% del N total de los forrajes verdes, los que están formados por amidas, aminoácidos libres, péptidos de bajo peso molecular, aminas, nucleótidos y otros. Los componentes NNP de los alimentos se difunden muy rápidamente en el líquido ruminal y son, junto con la urea de la saliva y exógena, las fuentes nitrogenadas más rápidamente disponibles para la población microbiana (Ørskov, 1985).

La fracción proteica de la ingesta que entra al rumen se digiere en diversas formas. Siendo la mayor parte de las proteínas dietarias degradadas por los microorganismos ruminales a compuestos más simples, tales como péptidos, aminoácidos y amoníaco (NH_3). La tasa y extensión de la degradación ruminal de la proteína dietaria está influenciada por su solubilidad en el líquido ruminal, la que depende del tipo de proteína presente en el alimento. En general, proteínas tales como albúminas y globulinas, que poseen una alta solubilidad en soluciones salinas diluidas, son de una alta tasa de degradación ruminal, y lo inverso ocurre con proteínas como las prolaminas y gluteninas presentes en el endospermo de cereales, los cuales son de baja degradabilidad ruminal (Baldwin et al. 1983; Owens et al. 1983).

La degradabilidad y solubilidad ruminal de las proteínas es afectada también por el tipo de procesamiento a que son sometidas durante su elaboración. También en el ensilaje se observan transformaciones de la materia orgánica, entre las cuales las proteínas son degradadas hasta aminoácidos y NH_3 , siendo esta proteólisis más importante cuanto menor y más lenta sea la disminución del pH. Entre los factores del animal, asociados con los procesos de degradabilidad proteica ruminal, está el tiempo de retención del alimento en el rumen o su velocidad de paso. Al aumentar la velocidad de paso, por efecto de un aumento del nivel de consumo de alimento o por molienda del forraje, se observa una disminución de la proporción de proteína degradada en el rumen. (Satter et al. 1981).

2.6. Factores que afectan la degradación de la proteína y almidón en el rumen.

La proteína no se degrada completamente en el rumen y el grado de degradación dependerá de la proporción de proteína susceptible de ser degradada, del ritmo de degradación y del tiempo en que permanece en el rumen (Ørskov et al. 1979). La estimación de la proteína no es fácil, ya que está influida por muchos factores, que se pueden agrupar en factores relacionados con el alimento y con el medio ambiente ruminal, muy determinado, a su vez por la dieta. Existen varios métodos para estimar su degradación, los cuales se describen en el apartado 4.1., 4.2., 4.3. y 4.4.

2.6.1. Características de la proteína

Tradicionalmente se ha asumido que la degradación de la proteína está condicionada por su solubilidad en el fluido ruminal, que facilitara su degradación al estar más expuesta a la acción de las proteasas de la flora ruminal (Owens et al. 1983; NRC, 2001), pudiendo incluso, estimular a las bacterias proteolíticas del rumen (Wallace et al. 1998). Sobre la solubilidad de la proteína en el rumen influye de un modo importante el pH del fluido ruminal, teniendo a ser mayor a 7 (Loerch et al. 1983) y menor cuando el valor de pH coincide con el punto isoeléctrico de la proteína (Clark, 1975). Sin embargo no existe una relación directa y simple entre la solubilidad de la proteína y su degradabilidad ruminal, puesto que existen proteínas muy solubles pero poco degradables como la albumina (Mahadevan et al. 1979) mientras que otras insolubles como la zeína, son fácilmente degradadas en el rumen (Mahadevan et al 1980). La estructura proteica y la presencia de enlaces disulfuro parece determinar la degradabilidad ruminal en mayor medida que la solubilidad (Wallace, 1983)

2.6.2. Procesamiento del alimento

La conservación y el método de procesamiento afectan la solubilidad de las proteínas. El ensilado supone la degradación previa de los componentes nitrogenados e incrementa la fracción de nitrógeno soluble, dando como resultado una mayor degradabilidad (Thomson et al. 1980; Merchen et al. 1983). El principal efecto del procesado es alterar el sitio de digestión de los nutrientes, y así conseguir un porcentaje de digestión (Theurer, 1986). El almidón en el sorgo se considera menos accesible a la degradación enzimática que otros granos (Rooney *et al.*, 1986).

El valor alimenticio de los granos de cereal está determinado por su contenido nutricional, características físicas y químicas que afectan su digestibilidad, aceptabilidad e interacciones asociativas con el proceso digestivo. Los métodos de procesamiento son seleccionados para lograr la mejor digestibilidad y aceptabilidad sin afectar el pH ruminal y causar problemas digestivos. El resultado de la aplicación de estos procesos son granos rolados o molidos en seco, de alta humedad, reconstituidos y granos rolados con vapor u hojueados (Theurer, 1986). El grano quebrado o molido puede ser fermentado si contiene

la cantidad adecuada de humedad (24 a 35 %) (Owens et al. 2005). El grano puede ser molido finamente para maximizar la digestión en tracto total, ya que las partículas que son grandes e hidrofóbicas resisten al ataque microbiano en el rumen y al enzimático en el intestino (Orskov, 1986; Owens *et al.*, 1997). Sin embargo, si se incluye suficiente forraje en la dieta para prevenir la acidosis y el ganado alimentado con frecuencia con una dieta integral, es improbable que el molido a un tamaño de partícula fino cause acidosis y además mejorará la digestibilidad del almidón y eficiencia alimenticia (Elizalde *et al.*, 1999).

2.6.3. Condiciones ruminales

En general, todas las situaciones que alteren las condiciones de fermentación ruminal afectaran indirectamente la actividad proteolítica y degradativa, debido a su efecto sobre el sustrato y el hábitat microbiano más que a un efecto directo sobre las enzimas. Un aumento en la proporción de concentrado en la dieta supone un descenso en el ritmo de degradación de la proteína (Ganev et al. 1979; Castrillo et al. 1992) debido a los cambios que se producen en la población microbiana, fundamentalmente por el descenso del pH ruminal. Teniendo en cuenta que la máxima actividad de las enzimas proteolíticas se encuentra en un rango de pH de entre 5.5 y 7.0, esta disminución no puede atribuirse al descenso de la actividad enzimática, sino a la disminución en el número de cepas bacterianas capaces de la degradación de péptidos y aminoácidos (Erflé et al. 1982), así como las bacterias celulolíticas, que rompen la integridad de la pared celular.

El aumento en el contenido proteico de la dieta incrementa la proteólisis, pero este incremento no es debido a una mayor actividad proteolítica de las bacterias, sino a un aumento en el número de las bacterias con mayor acción proteolítica pertenecientes al género *Butirivibrio* (Wallace et al. 1987). Cuando la concentración de amoníaco en el rumen es muy baja, disminuye la actividad proteolítica, debido, probablemente, a que la disponibilidad de nitrógeno para los microorganismos puede estar limitada (Ørskov, 1982)

2.6.4. Tiempo de retención

El rumen en un sistema de flujo continuo, y el tiempo de permanencia se verá afectado por los siguientes factores (Ørskov, 1992):

2.6.4.1. Nivel de alimentación

Se ha observado que cuando se aumenta la frecuencia de la alimentación de los animales, aumenta el ritmo de paso de líquidos, partículas y específicamente de los suplementos proteicos, lo que disminuirá el tiempo de retención ruminal repercutiendo negativamente sobre la degradabilidad efectiva (Tamminga, 1979; Ørskov, 1992; Ganev et al. 1979; Eliman et al. 1984).

Al incrementar el plano de alimentación aumenta la tasa de renovación del contenido ruminal y por consiguiente disminuye el tiempo de permanencia del alimento en el rumen. Se ha observado que un incremento en el plano de alimentación de una a dos veces mantenimiento, cuando se administra forraje granulado a ovejas, supone un incremento del ritmo fraccional de paso de las partículas de suplemento proteico en el rumen de un 2,2 a un 3,1% por hora, y que un incremento en la fracción de paja del 6 al 23% en dietas concentradas ofrecidas a corderos en cebo intensivo conlleva un incremento del ritmo fraccional de paso de 4,8 a 7,9% por hora, debido probablemente a la mayor salivación y motilidad ruminal provocada por el incremento de la proporción de paja en la dieta (Castrillo et al., 1992).

2.6.4.2. Frecuencia de distribución del alimento alimentación

Warner (1981) en una revisión sobre dinámica de tránsito, concluyó que el tiempo de retención se reduce al mitad cuando se administra el alimento más de una vez al día. En un estudio llevado a cabo por Soto – Navarro et al. (2000) en el que se evaluó la frecuencia de la alimentación y la fluctuación de la ingestión sobre la fermentación ruminal, muestran que ninguno de estos dos factores afectó el volumen del líquido ruminal ni el ritmo de paso de las partículas y el fluido. Otros autores (Elimam et al. 1985) tampoco encontraron diferencias significativas en el ritmo fraccional de paso al variar la frecuencia de administración de la dieta completa, o solo del concentrado, entre una y doce veces diarias.

2.6.4.3. Tamaño de partícula

En términos generales, la disminución en el tamaño de partícula produce descensos en el tiempo de retención ruminal, ya que las partículas pequeñas pueden abandonar antes el rumen por el orificio retículo – omasal (Eliman et al. 1984).

Tradicionalmente se ha afirmado que el ritmo de paso estaba influenciado por un tamaño de partícula crítico, de manera que una reducción en el tamaño de partícula en el alimento aumentaría la probabilidad de escape ruminal. Sin embargo, la reducción de 40 a 20 mm no tiene efecto en el ritmo de paso en la harina de pescado en el rumen en vacas en lactación, aunque una molienda más fina, 5 mm acompañada de la formación de pellets, si provocó una reducción en el ritmo de paso de este suplemento (Elimam et al. 1984). No obstante, algunos autores defienden que el tamaño de partícula sobre el ritmo de paso no sería directo, sino que estaría mediado por otros factores como: la retención de las partículas, cambios en el peso específico, la capacidad de hidratación de las partículas, la motilidad del retículo – rumen, y la cantidad de digesta expulsada en cada contracción (Firkins et al. 1998; Luginbuhl et al. 1990)

2.6.4.4. Relación forraje/concentrado

En dietas mixtas, incrementos de hasta un 30% de concentrado aumentan el ritmo de paso, mientras que por encima de esta proporción generalmente lo disminuyen. Esta disminución es debida a cambios en la población ruminal y a descensos en la degradación de la fibra, causados por la acidificación del pH. Sin embargo, el efecto de la relación forraje/concentrado sobre el ritmo de paso vendrá más determinado por el nivel de ingestión y por la calidad de forraje (Ørskov, 1992).

Otros factores como el estado fisiológico, la adición de tampones ruminales o la temperatura ambiental. Durante la gestación el ritmo de paso suele aumentar, debido a una reducción en el volumen ruminal por compresión del útero grávido, la adición de tampones ruminales tiene un efecto variable sobre la digestibilidad ruminal y el ritmo de paso dependiendo de la composición de la dieta base; y en cuanto a la temperatura ambiental, temperaturas altas incrementan el tiempo de retención (Warren et al. 1974).

3. Síntesis de proteína microbiana y su eficiencia

3.1. Síntesis de proteína microbiana

La síntesis de proteína microbiana se puede definir como la cantidad de proteína de origen microbiano producida en el rumen, y se expresa en gramos de N o de proteína (N X 6.25) por día (Van Soest 1994; Brodiscou et al. 1995). Sin embargo, en la práctica suele medirse como la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que fluye al intestino delgado del rumiante (flujo de proteína microbiana). El reciclaje de nitrógeno afecta la cantidad y eficiencia neta de la conversión de los sustratos en proteína microbiana, dado que la proteína microbiana degradada está sujeta a la desaminación, requiriéndose para su resíntesis (Dijkstra et al. 1998). Nolan et al. (1972) indicaron que el 30 a 50% de la proteína microbiana puede reciclarse en el rumen, mientras que Firkins (1996) menciona que el rango puede ser mayor (del 20 al 90% del total de la proteína microbiana sintetizada) dependiendo del tipo de dieta ofrecida.

Los nutrientes ofrecidos en la dieta son sintetizados por las bacterias, hongos y protozoarios para la síntesis de proteína microbiana (NRC, 2001), se ha señalado que dos tercios a tres cuartos de los aminoácidos absorbidos por el rumiante derivan de la proteína microbiana (Dewhurst et al. 2000). Existen trabajos de investigación recientes que indican que la proteína microbiana responde en promedio, por el 59% de la proteína que llega al intestino delgado (Clark et al. 1992), lo que denota la importancia de los mecanismos de síntesis proteica bacteriana y de los factores relacionados con ésta, siendo considerada la fuente proteica primaria para vacas lactantes (Nocek et al., 1988). De esta proteína microbiana el 25% corresponde a ácidos nucleicos, los cuales no pueden ser utilizados por el rumiante para la síntesis de tejidos, leche, etc. (AFRC 1993; Smith et al., 1970), por lo que son transformados en el hígado a derivados de purina y luego eliminados por la orina (Tamminga et al., 2000). Por lo tanto el 75% de la proteína microbiana corresponde a proteína microbiana verdadera, en forma de proteínas, péptidos y aminoácidos libres, de los cuales el 85% es digestible a nivel intestinal. De este modo el 63,8% de la proteína microbiana total (PMCT) corresponde a proteína microbiana digestible (PMCD) (AFRC 1993).

Los protozoarios aunque en determinados regímenes de alimentación pueden constituir más de un 40% de la masa microbiana ruminal (Veira, 1986), ya que contribuyen escasamente el 10% del flujo microbiano total, ya que son retenidos selectivamente en el rumen, especialmente cuando se suministran dietas con altos niveles de fibra (Weller et al. 1974; Hino et al. 1987). La proteína microbiana producida por parte de los hongos es menor, y la información disponible sobre su aporte al flujo microbiano es poca (Orpin, 1984), y se estima que es menor al 5% (Nolan, 1993).

3.2. Estimación de la síntesis de proteína microbiana

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana y de la degradación de la proteína del alimento en el rumen son dos puntos clave en todos los sistemas de valoración nutritiva para los animales rumiantes, esta cuantificación se realiza mediante la utilización de marcadores microbianos (Carro, 2001), para ello se requiere medir o estimar dos componentes: la cantidad total del marcador que sale del rumen y/o que fluye al intestino delgado (flujo total) y la concentración de ese marcador en los microorganismos (Brodisco et al. 1995). La medición del flujo total del marcador difiere del tipo de experimento. En los métodos *in vivo*, el procedimiento consiste en cuantificar o estimar el flujo total del marcador microbiano al abomaso o duodeno. Esta cuantificación puede realizarse mediante una colección total de la digesta en animales provistos de cánulas, ya que éstas permiten recoger la digesta y muestrearla en el duodeno. Sin embargo, este tipo de cánulas no es muy utilizado, debido a que su implantación exige un doble corte en la pared del duodeno, lo que afecta a la inervación del intestino y a su motilidad (Carro, 2001; Faichney, 1993; Titgemeyer, 1997; Tamminga et al. 2000). La medición puede realizarse de forma directa o indirecta. La medición directa consiste en la colección total de la digesta utilizando cánulas reentrantes (Beever et al. 1974; Oldham et al. 1977) aunque su colocación provoca alteraciones a nivel intestinal que limitan la obtención de muestras representativas (Faichney, 1993; Tamminga et al. 2000; Dewhurst et al. 2000). La medición indirecta consiste en utilizar células simples (tipo “T”), en cuyo caso se toman muestras puntuales representativas del flujo duodenal estimando el flujo total mediante el uso de una o dos sustancias indigestibles marcadoras de flujo. Entre los diversos métodos indirectos, el doble marcado es el más adecuado, y consiste en el uso de dos sustancias marcadoras en forma conjunta, una para marcar la fase líquida y otra para la fase sólida (Firkins et al. 1998).

Otro componente necesario para estimar la síntesis de proteína microbiana consiste en diferenciar la proteína sintetizada del resto de los compuestos nitrogenados que fluyen al intestino delgado (Cecava et al. 1990; Clark et al. 1992; Broudiscou et al. 1995). El procedimiento comúnmente utilizado consiste en:

- I. Aislamiento de microorganismos presentes en el rumen.
- II. Identificación de la proteína microbiana en el flujo total de la proteína mediante el análisis del marcador utilizado, el cual caracteriza los componentes microbianos presentes (Stern et al. 1979).
- III. Calcular la relación N: marcador en la digesta y en la muestra de microorganismos microbianos (Broderick et al. 1992; Broudiscou et al. 1995; Titgemeyer, 1997).

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana constituye uno de los aspectos más limitantes en el estudio de la alimentación proteica de los rumiantes. Sin embargo, su medición y/o predicción resulta muy variable, ya que está relacionado a la técnica de aislamiento microbiano, y a la relación de proteína microbiana y no microbiana (Broderick et al. 1992; Firkins et al., 1998; NRC, 2001)

3.2.1. Aislamiento microbiano

La obtención de una muestra representativa de los microorganismos ruminales constituye un aspecto fundamental para lograr una adecuada estimación de la síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, el aislamiento microbiano a partir de la digesta duodenal o ruminal constituye uno de los aspectos más difíciles de la investigación del metabolismo del nitrógeno en el rumen. Existen dificultades con las técnicas de muestreo y aislamiento, así como también con el tipo de población microbiana utilizada y su composición (Stern et al. 1994).

En la mayoría de los estudios en los que se ha determinado la síntesis de proteína microbiana es por medio del método *in vivo*, la muestra de microorganismos que se toma como referencia se ha aislado de la fase líquida del rumen, debido a que éste es el procedimiento más sencillo, aunque en algunos estudios se ha aislado también a partir del

contenido duodenal (Siddons et al., 1982; Kennedy et al., 1984; Schönhusen et al., 1995). Sin embargo, prácticamente en todos los estudios en los que se han aislado bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y a la fase líquida (BAL) del rumen se ha observado que ambas difieren en su composición química (Merry et al. 1983; Legay-Carmier et al. 1989), y que ésta a su vez difiere de la de los protozoos (Martin et al. 1994). En cuanto a los hongos ruminales, en el momento actual no existen datos definitivos sobre su composición química y su contribución a la proteína microbiana.

3.2.2. Factores que afectan el crecimiento microbiano

La síntesis de proteína microbiana se ve afectada por el tipo de sustrato energético y proteico, ya que la capacidad de síntesis de proteína microbiana depende de la energía liberada en el proceso fermentativo y del aporte adecuado de nitrógeno, siendo también importante la sincronización en la liberación de energía y nitrógeno en el rumen (Stern et al. 1979; Harrison et al. 1980; Buttery et al. 1992; Hoover 1991). La energía fermentable en el rumen es necesaria para que la fracción de la proteína dietaria degradable en rumen y el nitrógeno no proteico, sean eficientemente utilizados por los microorganismos del rumen, tanto para su crecimiento, como para la síntesis de sus proteínas constituyentes (AFRC 1995). Por lo tanto los concentrados energéticos se presentan como una fuente adicional de energía a ser considerada en la dieta de rumiantes ya que el crecimiento de los microorganismos depende principalmente de la degradación de la materia orgánica aportada al rumen, que proporciona la energía y los monómeros necesarios para la síntesis de los constituyentes celulares (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos).

La energía se obtiene fundamentalmente de la degradación de los carbohidratos (**Figura 3**), y el N puede ser de origen no proteico, de la proteína verdadera y/o del aporte endógeno (**Figuras 5**). Dependiendo del tipo de carbohidrato que contengan los concentrados, ya sean estos en base a almidón o fibra digestible, variaría la velocidad de fermentación en el rumen (Meijs 1986; Kibon y Holmes 1984) y por consiguiente la cantidad de proteína microbiana sintetizada (Webster 1993). Clark et al., (1992) verificaron que la alteración de la relación volumen/concentrado en la dieta podría influir el crecimiento microbiano, a raíz de la variación de energía. Otros nutrientes como el azufre, los ácidos grasos volátiles de cadena

ramificada, los minerales y las vitaminas, también son esenciales para la síntesis de proteína microbiana, aunque en una proporción menor. Numerosos factores relacionados con la dieta pueden alterar la disponibilidad de energía y nitrógeno para el crecimiento microbiano.

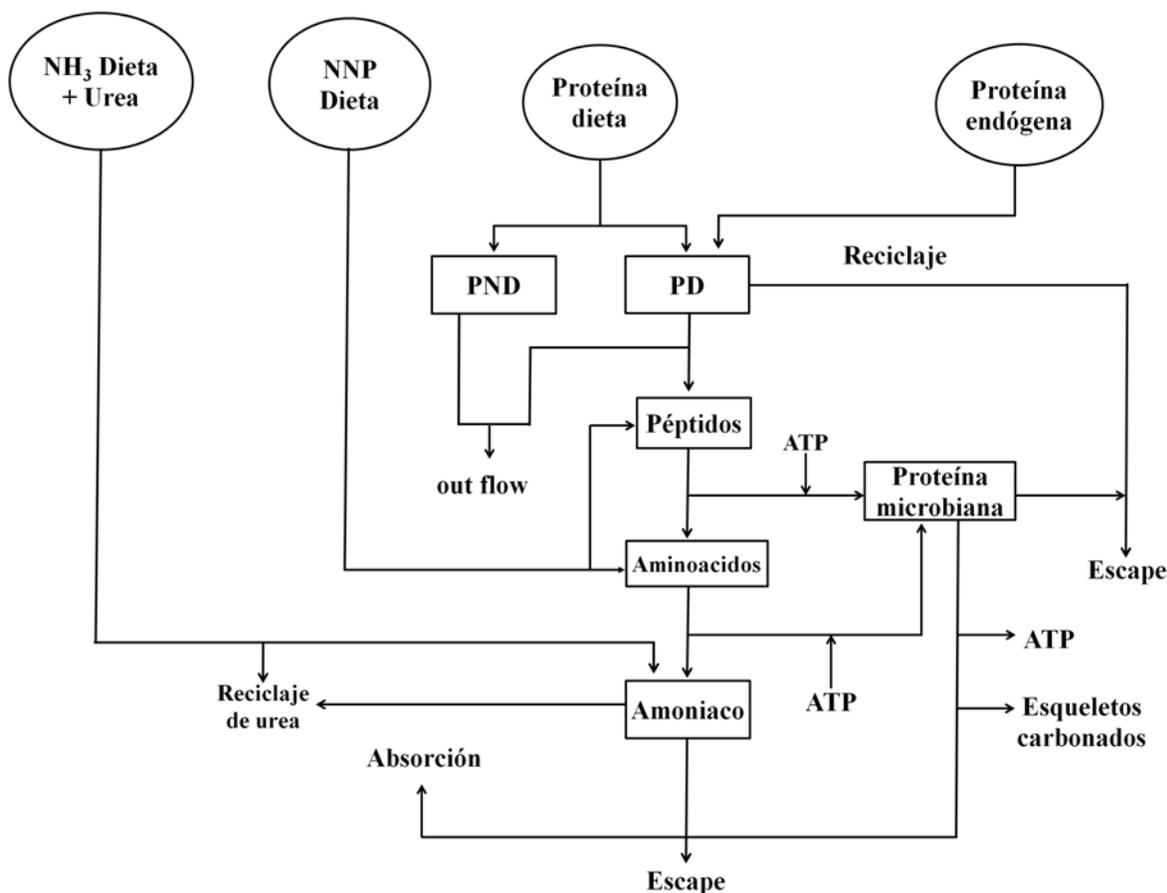


Figura 5. Representación esquemática del metabolismo del nitrógeno en el rumen (Fuente: Beaver, 1993)

3.2.3. Identificación de la proteína microbiana por medio de marcadores

El uso de marcadores ofrece una serie de ventajas en relación con el método de colección total de heces, ya que es menos laborioso y no requiere de la medición del consumo del alimento a evaluar y su excreción fecal, ya que las mediciones pueden realizarse directamente de las muestras del alimento y de las heces (Van Keulen et al., 1977; Bondi, 1989; Van Soest, 1994). La cuantificación a través de la determinación de

marcadores presenta desventajas tales como: el empleo de animales canulados (Vagnoni et al 1997; Tebot et al 2002), la dificultad en la obtención de una muestra representativa de la población microbiana y las limitaciones inherentes a cada marcador (Obispo et la. 1999). Una vez que los ácidos nucleicos microbianos abandonan el rumen, sufren una digestión extensiva en el intestino delgado, los nucleótidos de purina son hidrolizados en nucleósidos y bases libres, las cuales después de ser absorbidas, son metabolizadas por el animal y excretadas en la orina en forma de alantoína y otros metabolitos. Por tanto, se ha propuesto que la excreción urinaria de derivados púricos es un parámetro válido para estimar, a través de ecuaciones, la síntesis de proteína microbiana (Chen et al. 1995; Funaba et al 1997).

La cuantificación del crecimiento microbiano en el rumen se puede llevar a cabo únicamente mediante la utilización de marcadores microbianos (Schönhusen et al., 1995). Cada marcador presenta una serie de ventajas e inconvenientes (Warner, 1981), pero el método más utilizado actualmente es la técnica del doble marcador propuesta por Faichney (1975), que combina un marcador de la fase sólida y otro de la líquida. Se debe tener en cuenta la utilización de un marcador microbiano adecuado.

3.3. Tipos de marcadores

Los marcadores son compuestos de referencia utilizados para monitorear aspectos químicos y físicos de la digestión, estimar el flujo de la digesta, digestibilidad total o parcial y la producción fecal en diversas especies animales. Según Broderick et al., (1992) un marcador microbiano «ideal» debería cumplir los siguientes requisitos: (1) ser fácil de determinar y cuantificar, (2) no formar parte de los alimentos que reciben los animales, (3) distribuirse de manera uniforme en todas las especies microbianas ruminales y (4) ser biológicamente estable. Dehority (1995) añade otros requisitos: (5) no ser absorbido en el tracto digestivo, (6) estar en una proporción constante en los microorganismos ruminales en todas las fases de su crecimiento y (7) que todas sus formas (ej. libre o formando parte de células intactas de microorganismos ruminales o de alguna de sus partes) presenten el mismo ritmo de tránsito a través del tracto digestivo. Sin embargo, ninguno de los marcadores que se utilizan hasta el momento cumple con todos los requisitos señalados anteriormente (Broderick et al., 1992; Obispo et al., 1999), por lo que la elección de uno u

otro para realizar estudios sobre la síntesis de proteína microbiana en el rumen resulta especialmente complicada.

Para que un marcador pueda ser validado, debe ser comparado con un patrón, en el caso de la digestibilidad aparente, es la recolección total de heces, recuperación imparcial de heces, variación en la tasa de pasaje por rumen, muestreos poco representativos y delineamiento estadístico son los problemas principales asociados a experimentos donde se utilizan los marcadores (Titgemeyer, 1997). Los marcadores microbianos se clasifican en dos grandes grupos: marcadores internos y externos.

3.3.1. Internos

La principal característica de los marcadores internos es que son constituyentes de las células microbianas o constituyentes naturales del alimento, y por ello no necesitan ser administrados a los animales experimentales. Por el contrario, los marcadores externos deben ser administrados a los animales experimentales para que sean incorporados por los microorganismos ruminales y formen parte de sus estructuras.

Los principales marcadores internos son: los ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)), las bases púricas (purinas), lignina, FDN y FDA indigestibles, cenizas insolubles en ácido, N – Alcanos.

3.3.1.1. Ácidos nucleicos y bases púricas

La utilización de estas sustancias como marcadores microbianos se basa en las altas concentraciones de ADN y, especialmente, de ARN presentes en los organismos unicelulares (Broderick et al., 1992). Su utilización como marcadores microbianos se remonta a la década de los sesenta, en la que diversos autores observaron que la síntesis de proteína microbiana en el rumen estaba relacionada con el flujo total de polinucleótidos (Ellis et al., 1965) y con la excreción urinaria de derivados púricos (Topps et al., 1965). Posteriormente se han utilizado como marcadores microbianos el total de ácidos nucleicos (Zinn et al., 1986; Ushida et al., 1985), el ADN (Arambel et al., 1982) y el ARN (Ling et al., 1978; Merry et al., 1983; Schönhusen et al., 1995), aunque en los últimos años la

utilización de las purinas ha adquirido un mayor protagonismo (Pérez et al., 1996a, 1997b; Calsamiglia et al., 1996; Carro et al., 1999).

El análisis de purinas (Zinn et al., 1986) es simple, rápido y más barato que la mayoría de los otros procedimientos utilizados para estimar la síntesis microbiana en el rumen. Sin embargo, la utilización de las purinas como marcador microbiano presenta también algunos inconvenientes. En primer lugar, los ingredientes que forman parte de las raciones de los animales contienen, en mayor o menor cantidad, purinas. Algunos alimentos presentan contenidos muy inferiores a los existentes en los microorganismos ruminales, pero otros (ej. harina de pescado) presentan valores ligeramente menores a los encontrados por algunos autores en estos microorganismos (Titgemeyer et al., 1989; Pérez et al., 1996b; Carro et al., 2001). La degradabilidad de las purinas de origen alimenticio se ha determinado en algunos estudios, pero los resultados obtenidos son contradictorios. Algunos autores (McAllan et al., 1973a; Schelling et al., 1984) concluyen que el flujo duodenal de purinas de origen alimenticio es insignificante, a pesar de que otros estudios, en los que se marcaron los ácidos nucleicos microbianos con fósforo (P) (Smith et al., 1978) o con nitrógeno (N) (Pérez et al., 1997a), señalan que, dependiendo de la ración ingerida por los animales, hasta un 30 % del flujo duodenal de purinas puede ser de origen alimenticio, lo que provocaría una sobreestimación de la síntesis de proteína microbiana cuando se utilizan las purinas como marcador. Un segundo inconveniente es que la relación purinas/N no es la misma en las bacterias y protozoos, e incluso varía en las diferentes especies bacterianas. Arambel et al. (1982) analizaron las relaciones ARN/N y ADN/N en diecisiete especies bacterianas ruminales y observaron que éstas oscilaban en 8,0 y 102 y entre 0,2 y 39, respectivamente. Cuando las bacterias se agruparon según las características de su pared celular, observaron que los valores medios de la relación ARN/N eran de 37 y 62 para las bacterias gram-positivas y gram-negativas, respectivamente, y de 8,8 y 19 para la relación ADN/N. Estas diferencias entre bacterias se han observado también en la relación purinas/N. En la mayoría de los trabajos en los que se han comparado distintos extractos microbianos, se ha observado que las bacterias asociadas a sólidos (BAS) presentan un menor contenido en purinas (o en ARN y ADN) y una menor relación purinas/N, tanto en estudios *in vivo* (Merry et al., 1983; Le gay-Carmiery et al., 1989; Pérez et al., 1996b, 1997b, 1998; Martín-

Orúe et al., 1998), como *in vitro* (Carro et al., 2001). Estas diferencias parecen deberse a las características intrínsecas de las diferentes especies que integran cada fracción bacteriana y al menor ritmo de crecimiento de las BAS en comparación con las bacterias asociadas a líquidos (BAL) (Bates et al., 1985; Legay-Carmier et al., 1989).

La determinación de la cuantía de la síntesis microbiana dependerá de la proporción de BAS presente en el rumen. Esta proporción depende del tipo de ración que reciben los animales, pero puede llegar a ser de un 90 % en animales que reciben raciones constituidas únicamente por forrajes (Merry et al., 1983). Una solución válida para disminuir este problema sería obtener extractos bacterianos representativos de todas las bacterias ruminales, que incluyeran tanto las BAL como las BAS. A pesar de que existen diversos procedimientos para aislar las BAS, su eficacia suele ser pequeña debido a que estas bacterias se encuentran firmemente adheridas a las partículas de alimento. La mayoría de los métodos comúnmente utilizados para desligar las BAS de las partículas de alimento permiten liberar entre un 30 y un 60 % de las mismas (Merry et al., 1983; Legay-Carmier y Bauchart, 1989; Martín-Orúe et al., 1998), aunque otros autores (Whitehouse et al., 1994; Ranilla et al., 2001) han utilizado procedimientos que permiten desligar aproximadamente un 80 % de las BAS. Sin embargo, algunos de estos procedimientos pueden afectar a la integridad de las bacterias y ocasionar pérdidas celulares que modifican relación purinas/N, tal y como han observado Martín-Orúe et al. (1998) y Carro et al. (2001). Por otra parte, incluso cuando se han aplicado procedimientos que permiten un alto porcentaje de separación de las BAS, la recuperación final de éstas en el pellet bacteriano es inferior al 60 % (Ranilla et al., 2001). Son muy pocos los estudios en los que se ha intentado aislar un extracto bacteriano «representativo». Carro et al. (2001) aislaron un extracto bacteriano que incluía bacterias asociadas a la fase sólida y líquida de la digesta obtenida de un fermentador semicontinuo (RUSITEC), y observaron que la relación purinas/N de dicho extracto presentó un valor intermedio entre los encontrados en las BAL y las BAS.

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales ventajas de las purinas como marcador microbiano es que su análisis por el método de Zinn y Owens (1986) es simple, rápido y barato. Sin embargo, Makkar et al. (1999) observaron que la recuperación

de purinas de extractos bacterianos ruminales que habían sido añadidos a celulosa, almidón y fibra neutro detergente era solamente del 50 % cuando se usaba este método, y propusieron la utilización de la técnica descrita por Balcells et al. (1992) para obtener una recuperación de las purinas cercana al 100 %. Dicha técnica utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por lo que para llevar a cabo los análisis de purinas se necesita disponer de un equipo de HPLC. A pesar de todos los inconvenientes anteriormente descritos, las purinas son recomendadas como uno de los métodos de elección para determinar la síntesis de proteína microbiana (Broderick et al., 1992; Brodiscou et al., 1995).

3.3.1.2. Derivados púricos

La excreción urinaria de derivados púricos (DP) en rumiantes puede ser usada para estimar el flujo intestinal de proteína microbiana, una vez que hayan sido determinadas la relación cuantitativa entre la excreción de derivados de púricos y su absorción de purinas (Chen et al., 1990b). Las purinas que llegan al duodeno pueden ser absorbidas y posteriormente reutilizadas por el animal o metabolizadas y excretadas en la orina en forma de alantoína y otros metabolitos (McAllan, 1982). La excreción de derivados de purinas está directamente relacionada con la absorción de las mismas y con el conocimiento de la relación entre nitrógeno (N) purínico y el N total en la masa microbiana. La absorción de N microbiano puede ser calculada a partir de la cantidad de purina absorbida, que es estimada por intermedio de la excreción urinaria de derivados de purinas (Chen et al., 1990a; Verbic et al., 1990; Chen et al., 1992).

Debido a ello se ha propuesto que la excreción urinaria de derivados púricos (DP) puede constituir un parámetro válido para estimar el flujo duodenal de proteína microbiana. Las purinas de los microorganismos ruminales que llegan al duodeno son absorbidas rápidamente a través de la mucosa intestinal, en forma de nucleótidos o como bases libres, si bien en el ganado vacuno sufren una cierta degradación a ácido úrico en su paso por la mucosa (Stangassinger et al., 1995). Las purinas absorbidas se transportan hasta el hígado, donde tiene lugar su utilización y degradación. Tras su metabolismo, las purinas se excretan en la orina en forma de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, aunque en el ganado

vacuno las cantidades de estos dos últimos compuestos son insignificantes (Verbic et al., 1990). Otras vías de excreción son la saliva y la leche, pero cuantitativamente representan una pequeña proporción (Chen et al., 1990a). La estrecha relación existente entre la excreción urinaria de DP y el flujo duodenal de células microbianas se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos (Sibanda et al., 1982; Balcells et al., 1991; Chen et al., 1990b; 1991), y ha permitido el desarrollo de ecuaciones que permiten predecir el flujo duodenal de N microbiano a partir de la excreción urinaria de DP en el ganado vacuno (Verbic et al., 1990) y ovino (Chen et al., 1990b; Balcells et al., 1991), aunque hasta el momento no se dispone de ninguna ecuación para el ganado caprino. La utilización de la excreción urinaria de DP para estimar el flujo duodenal de N microbiano presenta varias ventajas respecto a otros métodos. La ventaja principal es que se trata de una técnica no invasiva, con lo cual los posibles trastornos en el comportamiento alimentario de los animales o en su motilidad digestiva (producidos por la implantación de cánulas) quedan descartados. Por otra parte, esta técnica es relativamente fácil de llevar a cabo en la mayoría de las circunstancias, ya que únicamente se necesita realizar la recogida de la orina de los animales. En algunos estudios (Lebzien et al., 1993; Giesecke et al., 1994) se ha puesto de manifiesto la relación existente entre la excreción de alantoína en leche y el flujo duodenal de N microbiano, hecho que abre nuevas posibilidades a esta técnica. La posibilidad de estimar el flujo duodenal de N microbiano a partir de la concentración de alantoína en la leche (se ha observado que el ácido úrico excretado en la leche procede en su mayoría del metabolismo de la glándula mamaria, Giesecke et al., 1994) es especialmente interesante, ya que en las vacas lecheras interesa lograr un alto ritmo de síntesis de proteína microbiana debido a la repercusión que tiene la nutrición proteica no sólo en la producción de leche, sino también en la función reproductora (Ferguson et al., 1989). Si bien los resultados obtenidos son sólo aproximados, esta técnica resulta muy útil en aquellos casos en los que no se puede predecir la síntesis de proteína microbiana porque no se conoce la energía ingerida por los animales (ej. cuando los animales reciben forrajes), y no resulta complicado llevarla a cabo, ya que el muestreo de la leche durante el ordeño es una práctica habitual (Stangassinger et al., 1995).

Otro aspecto conflictivo es que en el cálculo del flujo duodenal de N microbiano a partir de la excreción urinaria de DP se asume que los microorganismos ruminales presentan una relación purinas/N constante, ya que ésta no es determinada en cada experimento. Sin embargo, esta relación varía con los factores que se han comentado anteriormente, e incluso se ve afectada por las características de la ración, como son la cantidad de proteína de la misma y su relación forraje:concentrado (Clark et al., 1992). Por otra parte, se ha observado que existen diferencias en el metabolismo de las purinas entre las diferentes especies animales, y también entre animales jóvenes y adultos (Stangassinger et al., 1995). La identificación de estas diferencias permitiría desarrollar modelos que pudieran aplicarse a todo tipo de animales, así como extrapolar los datos de una especie a otra.

Por otra parte se debe tener en cuenta que la excreción urinaria de DP, es un parámetro que refleja posibles cambios en la eficiencia de digestión y absorción de los microorganismos, es decir, es un parámetro que refleja la biodisponibilidad del N microbiano, mientras que el flujo duodenal de N microbiano determinado directamente mediante el uso de marcadores es independiente de estos procesos (Stangassinger et al., 1995), por lo que hay que considerar que las estimaciones del flujo duodenal de N microbiano obtenidas a partir de la excreción urinaria de DP no son valores exactos (Broderick et al., 1982; Chen et al., 1992; Stangassinger et al., 1995).

3.3.1.3. Lignina.

La lignina es el único gran polímero de las plantas cuyos componentes no se encuentran claramente reconocidos (Van Soest, 1994; Reeves, 1997). La lignina es la responsable de la resistencia mecánica, y protege los tejidos de la digestión microbiana, por lo que afecta la digestibilidad de los tejidos vegetales (Reeves, 1997). Los compuestos fenólicos que componen la lignina son derivados de dos vías metabólicas presentes en todas las plantas vascularizadas: la vía del ácido chiquímico y la vía del acetato-malonato. La lignina es un polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas C_6C_3 o simplemente unidades C_9 , repetidas de forma irregular, que tienen su origen en la polimerización deshidrogenativa del alcohol coniferílico (Fengel et al., 1984). La lignina se encuentra

naturalmente en la pared celular vegetal y está formada por tres polímeros condensados: alcoholes p-cumaril, coniferil y senapil, que se entrecruzan en una malla compleja, resistente a la hidrólisis ácida y a varios procesos enzimáticos, inclusive a enzimas microbianas y del tracto gastrointestinal de animales rumiantes (Fukushima et al., 2003).

La determinación de la lignina es utilizada por muchos investigadores para monitorear estudios de digestión con rumiantes (Muntifering, 1982; Reeves, 1997), considerando que no puede ser digerida y presentar una recuperación cuantificable en las heces. Algunos autores han sugerido que el detergente ácido y el detergente neutro remueven alguna lignina verdadera (Fahey et al., 1983). Este punto de vista considera todos los fenoles de la pared celular, incluyendo los ésteres de ácido ferúlico y p-cumárico como lignina (Van Soest, 1994), lo que reitera la dificultad de hablar de ella como un término absoluto y universal. La aparente digestión de la lignina puede ser consecuencia de la formación de complejos solubles carbohidrato-lignina que pasan a través del rumen, y presumiblemente el intestino, como polímeros en solución que no son recuperados en las heces. El tránsito de la lignina por el sistema digestivo del rumiante se modifica de manera tal, que un mayor número de grupos fenólicos son liberados y expuestos (Fahey et al., 1979). La lignina ha demostrado, no ser una sustancia inerte en el proceso digestivo de rumiantes, su digestibilidad parcial ha sido reportada como una característica inapropiada para una sustancia de referencia, a ser empleada en la determinación indirecta de la digestibilidad de otros nutrientes de la ración (Sullivan, 1955).

Otras razones de la aparente digestibilidad de la lignina (Merchen, 1993; Van Soest, 1994) las cuales incluyen los preparados de lignina provenientes de plantas inmaduras de bajo contenido de lignina, pueden presentar componentes diferentes a ésta; la presencia de compuestos digestibles puede incidir en su aparente digestibilidad, por lo que la lignina de pastos inmaduros no debe ser empleada como marcador en ensayos de digestibilidad, ya que se dificulta su recuperación en heces, aún cuando esta es virtualmente indigerible (Van Soest, 1994).

Las principales limitaciones para el uso de la lignina como marcador son su grado de digestibilidad y la necesidad de realizar colección total de las heces para la obtención de muestras representativas (Weir et al., 1959), aún cuando se han reportado variaciones en cuanto a la recuperación de la lignina determinada por este método (Fahey et al., 1983). Numerosas observaciones de desaparición de la lignina a través de su paso por el tracto digestivo han indicado coeficientes aparentes de digestión que van desde 8 hasta 53% (Merchen, 1993); otros investigadores señalan que la variabilidad en cuanto a los coeficientes de digestión va del 2 al 42% (Dearriba, 1988).

3.3.1.4. FND y FDA indigestibles

La fibra indigestible, es una adecuada medida, como indicador interno útil para estimar la digestibilidad en experimentos de pastoreo (Lippke et al., 1986). El uso de la fibra en detergente neutro indigestible (FDNi) ha mostrado resultados promisorios como indicador interno. De hecho, su uso en ensayos de digestibilidad ha mostrado resultados semejantes a los obtenidos con cutina (Ezequiel et al., 1999). Sobrestimaciones de flujo de MS duodenal y fecal fueron observadas con la FDNi, resultando en coeficientes de digestibilidad subestimados (Zeoula et al., 2002). La FDNi en comparación con otros indicadores, como la fibra en detergente ácido indigestible (FDAi), óxido crómico y cloruro de iterbio fue evaluada por Berchieli et al. (1998) que observaron que la FDNi y la FDAi presentaron una menor variación y no difirieron entre sí en la determinación de la digestibilidad.

3.3.1.5. Cenizas insolubles en ácido

Las cenizas insolubles en ácido (CIA), se forman de minerales no digestibles como el sílice, o bien por minerales que se encuentran formando compuestos muy estables (quelatos), que no pueden ser liberados por el medio predominante en el aparato digestivo. Por lo anterior, la CIA sirve para medir la digestibilidad de los alimentos “*in vivo*”. (McCarthy, 1974)

La ceniza residual de la determinación de fibra detergente ácido. Conocida como CIDA y la ceniza insoluble en ácido (CIA), han sido empleadas como indicadores internos para estimar la digestibilidad de nutrientes en caprinos, bovinos y equinos con resultados

satisfactorios. Sin embargo; para que la recuperación fecal no sea subestimada, el alimento debe contener cerca de 0.75% de CIA y una concentración superior al 3% de CIDA en la materia seca (Araujo et al. 2000). Sunvold et al. (1991) citan datos precisos para la digestibilidad de la materia orgánica utilizando CIA en dietas basadas en heno y forraje para novillos de carne.

3.3.1.6. Nitrógeno en heces

Un método poco frecuente se basa en la relación que debe existir entre la digestibilidad y la concentración del nitrógeno fecal. Lancaster (1947) fue el primer investigador en establecer la relación entre la digestibilidad de la materia orgánica y el contenido de nitrógeno en las heces. Esta técnica ha probado tener éxito tanto en pasturas de clima templado (Thomas et al., 1976; Barthiaux et al., 1986) como tropicales (Boval et al., 1996). El método está basado en una relación, desarrollada con animales en confinamiento, entre la digestibilidad del forraje estimada a partir de la prueba convencional in vivo y la concentración del indicador en las heces, dicha relación es utilizada para predecir consumo en pruebas de pastoreo. Las ecuaciones de regresión son tanto lineales como cuadráticas y las pendientes de las ecuaciones son altamente variables; por tanto, es recomendable utilizar ecuaciones para cada especie vegetal, sitio geográfico e inclusive para cada corte (Greenhalgh et al., 1960; Langlands, 1975). Cameron et al. (1993) desarrollaron algunas relaciones entre digestibilidad de forrajes de zonas templadas vs especie, corte y época del año (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Modelos de predicción para la digestibilidad de la materia orgánica de forrajes de zonas templadas.

Ecuación de regresión	R ²	Error residual estandar				
		General	Efecto de especies (G/L)	de Primer corte	Rebrote de primavera	Rebrote de otoño
0.612+0.0427fN	0.72	0.020	0.008	NS	NS	NS
0.342+0.188fN – 0.0187 fN ²	0.83	0.016	0.011*	0.009	0.004	-0.013
0.78+0.0334fN – 0.0038fADF	0.89	0.013	0.005	0.007	0.008	0.015

G: Gramínea L: Leguminosa * Significativo al 5%

fN: Nitrógeno fecal fADF: Fibra ácido detergente fecal

Adaptado de Cameron et al., 1993)

La técnica de nitrógeno fecal parece ser una opción adecuada pero requiere de un desarrollo continuo de curvas de regresión que relacionen este compuesto con la digestibilidad de la dieta, además se debe considerar el consumo individual entre animales. El uso limitado de este método es debido a que los animales pueden seleccionar en la dieta diferentes especies de forraje, o son suplementados provocando una interacción entre los ingredientes en términos de digestibilidad (Peyraud, 1996)

3.3.1.7. N – Alcanos

Los N – Alcanos son componentes naturales de la cera cuticular de vegetales, predominantemente formados por cadenas impares de 25 a 35 átomos de carbono. Estos compuestos tienen varias características interesantes, el largo de la cadena de carbonos de los principales n-alcanos detectados están usualmente en el rango de C25 (pentacosano) a C35 (pentatriacontano); los alcanos de cadenas impares están presentes en mayores cantidades que los n-alcanos de cadenas pares, mientras que C29 (nonacosano), C31 (entriacontano) y C33 (tritricontano) son n-alcanos dominantes, existiendo una diferencia marcada entre sus niveles y patrones.

El uso de n – alcanos de cadena larga fue propuesto por Mayes et al. (1986) como método para estimar el consumo. Su aplicación en estudios con rumiantes en pastoreo ha alcanzado resultados bastante alentadores (Reeves et al. 1996). En sustitución al óxido de cromo, la técnica prevé la administración a los animales de n – alcanos sintéticos de cadena larga con un número par de carbonos, con el fin de obtener estimativas individuales de producción fecal considerando que su concentración en las plantas es baja (<40 mg/kg MS) o muchas veces no detectables. Concomitantemente, la digestibilidad del forraje consumido es estimada con el uso de marcadores internos, como los n – alcanos, sustituyendo los valores de digestibilidad *in vitro* (Iopes et al., 2001). Sin embargo, para que el consumo de forraje estimado sea más preciso, se recomienda que la concentración de n-alcanos en la planta sea mayor a 50 mg/kg MS. Burns et al. (1994), mencionan que el análisis de n – alcanos por medio de cromatografía gaseosa es más simple y precisa.

El uso de n-alcanos naturales como marcadores para estimar la digestibilidad, exige hacer algunas correcciones debido a su incompleta recuperación, en el **Cuadro 5** se puede observar que la variación en la recuperación fecal de estos es baja. Dove et al. (1990 y 1992) demostraron que el uso de n-alcanos como marcadores, pueden dar estimaciones más adecuadas que las técnicas *in vitro* o con el uso de lignina.

Cuadro 5. Recuperación de n – alcanos en duodeno e íleon terminal de heces de ovinos alimentados con rygrass perenne (*Lolium spp.*) fresco.

Tipo de n - alcano	Sitio de recuperación					
	Duodeno		Íleon terminal		Heces	
	Media	E.S.	Media	E.S.	Media	E.S.
C ₂₇	1.037	0.0387	0.626	0.0250	0.594	0.0174
C ₂₈ *	0.877	0.0424	0.759	0.446	0.786	0.0210
C ₂₉	0.997	0.0354	0.745	0.0224	0.697	0.0144
C ₃₁	0.965	0.0340	0.815	0.0214	0.779	0.0095
C ₃₂ *	0.821	0.0433	0.819	0.0329	0.859	0.0101
C ₃₃	0.988	0.0348	0.875	0.0209	0.839	0.0127
C ₃₅	1.013	0.0352	0.977	0.0219	0.953	0.0090
C ₃₆	0.841	0.0415	0.876	0.0373	0.922	0.0115

Fuente Mayes et al., 1988. * n – alcano administrado.

La medición del consumo con la técnica de los n-alcanos tiene las ventajas de que no requiere de estimaciones previas de la excreción diaria de heces ni de la digestibilidad de la dieta, pero sí de la obtención de muestras representativas de la dieta. Además, no es afectada por los factores inherentes al alimento y al animal, que podrían modificar la digestibilidad (Mayes et al., 2000).

3.3.2. Externos

Los marcadores externos deben ser administrados a los animales experimentales para que sean incorporados por los microorganismos ruminales y formen parte de sus estructuras. El procedimiento más empleado consiste en realizar una infusión continua del marcador en el rumen de los animales durante el período experimental hasta que se alcanzan condiciones de equilibrio. Los principales marcadores externos son:

3.3.2.1. Óxido de cromo (Cr_2O_3)

El óxido de cromo en polvo es uno de los muchos compuestos con cromo con características de indicador inerte (Kotb et al., 1972) destacado como el más antiguo y comúnmente empleado de los marcadores externos (Pond et al., 1989; Basurto et al., 1992; Merchen, 1993; Van Soest, 1994). Es prácticamente insoluble en agua y no se asocia con los componentes de la ingesta (Pond et al., 1989) viaja en la digesta en forma de suspensión, a una velocidad diferente a las correspondientes tanto a la fase líquida como a la fase sólida o particulada, pudiendo formar un sedimento en el retículo-rumen y ser transferido esporádicamente al tracto gastrointestinal (Merchen, 1993) lo que afecta directamente el patrón de excreción del marcador. El óxido de cromo, ofrece la ventaja de tener una recuperación completa en las heces y, existen varios métodos analíticos confiables para su determinación, resultando de gran utilidad para pruebas de digestibilidad (Merchen, 1993). Sin embargo, otros investigadores han reportado que su determinación es tediosa y presentan dudas sobre lo adecuado de los métodos de estimación (Kotb et al., 1972). Además, el empleo del óxido de cromo en ensayos con rumiantes, ofrece resultados menos precisos debido a su excreción fecal irregular (Crampton et al., 1969). La técnica depende básicamente del muestreo, de manera que la variación diaria de la excreción fecal del marcador no contribuya como una fuente de error (Van Soest, 1994). Se ha reportado efecto del forraje consumido por los animales sobre el comportamiento del marcador, aún en condiciones de liberación continua del cromo a nivel ruminal (Hollingsworth et al., 1995), por lo que las variaciones diurnas en la excreción del óxido de cromo han limitado su aprovechamiento (Anzola et al., 1981; Laredo et al., 1988).

Algunos trabajos muestran que el óxido de cromo posee una tasa de pasaje más rápida por el rumen que el material fibroso y la posibilidad de su acumulación en alguna parte del tubo digestivo (Van soest, 1994), también se han citado sus efectos carcinogénicos (Peddie et al. 1982). Debido a estos inconvenientes, se han estudiado nuevos indicadores que frecuentemente sustituyen el óxido de cromo en estudios de digestibilidad.

3.3.2.2. N¹⁵

El N¹⁵ se administra a los animales experimentales en forma de sales amónicas (¹⁵NH₄Cl, (¹⁵NH₄)₂SO₄) o de urea. Estas sustancias se disuelven fácilmente en agua, y tras un período de infusión de 3-4 días se consigue un enriquecimiento constante de los microorganismos ruminales (Firkins et al., 1987; Beckers et al., 1995). El N¹⁵ es uno de los marcadores externos más utilizados, tanto en estudios *in vivo* (Carro et al., 1992a; Lebzien et al., 1993; Pérez et al., 1996a, 1996b) como *in vitro* (Carro et al., 1992b; Blümmel et al., 1997; Carro et al., 1999). Este hecho es debido a algunas de las ventajas que presenta: 1) es un isótopo no radioactivo, por lo que puede ser utilizado en cualquier ocasión sin riesgos de contaminación medioambiental; 2) los alimentos de los animales no suelen presentar enriquecimientos en N¹⁵ superiores a la abundancia natural (0,3663), y la infusión de N¹⁵ únicamente enriquece a los microorganismos; 3) el N¹⁵ infundido se incorpora a todos los microorganismos, ya que las bacterias incorporan el ¹⁵NH₃ y los protozoarios lo incorporan indirectamente cuando ingieren y digieren a las bacterias, aunque el grado de enriquecimiento de las diferentes fracciones de microorganismos suele ser diferente.

Otra ventaja del N¹⁵ es que marca directamente el N microbiano, es decir, el material que se desea determinar. Sin embargo, lo que realmente se determina con este método es la incorporación de ¹⁵NH₃ por los microorganismos, y no se tiene en cuenta la incorporación directa de aminoácidos y péptidos. Este hecho cobra una especial importancia si se tiene en cuenta que las diferentes especies bacterianas ruminales difieren en la utilización de amoníaco y N aminoacídico para su síntesis proteica (Russell et al., 1992). En varios estudios (Komisarczuk et al., 1987; Carro et al., 1999; Ranilla et al., 2000) se ha observado que las BAS incorporan una menor proporción de amoníaco que las BAL, por lo que resulta lógico que presenten habitualmente un menor enriquecimiento en N¹⁵ (**Cuadro 6**). Este hecho se ha observado tanto en condiciones *in vivo* (Martin et al., 1994; Beckers et al., 1995; Pérez et al., 1996b), como *in vitro* (Komisarczuk et al., 1987; Carro et al., 1999; Ranilla et al., 2000). Por ello, cuando se utilizan las BAL como extracto microbiano de referencia se subestima la síntesis de proteína microbiana. Carro et al. (1998) observaron que la síntesis microbiana en fermentadores semicontinuos (RUSITEC), al que se administraban cuatro raciones diferentes, era una media de un 22 % menor cuando se

usaban las BAL como extracto de referencia que cuando se usaban las BAS. Tal y como se ha comentado para otros marcadores microbianos, este problema podría solucionarse mediante el aislamiento de una fracción microbiana representativa.

Cuadro 6. Valores de la relación N^{15}/N en muestras de bacterias (BAL: bacterias asociadas a la fase líquida; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida) y protozoarios aislados en el rumen.

Cuadr 6

Marcador microbiano y referencia	Origen de los microorganismos	Ración	BAL	BAS	Bacterias mixtas	protozoarios
Firkins et al., 1987	Rumen (Bovino)	Forraje:concentrado (70:30)	0.748	0.749	-	0.631
Komisarczuk et al., 1987 ¹	<i>In vitro</i> (Rusitec)	Pulpa de remolacha (50:29:21)	0.932	0.611	-	-
Martin et al., 1994 ¹	Rumen (Bovino)	Heno	0.525	0.479	-	0.456
		Heno:cebada grano (65:35)	0.536	0.476	-	0.564
Pérez et al., 1996 ¹	Rumen (Ovino)	Heno:concentrado (67:33)	0.563	0.521	-	-
Pérez et al., 1997	Rumen (Ovino)	Paja cebada:concentrado(40:60)	0.480	0.478	-	-
Martin-Orue et al., 1998 ¹	Rumen (Ovino)	Paja:cebada grano (80:20)	0.649	0.629	-	-
		Paja:cebada grano (20:80)	0.611	0.538	-	-
Chikunya et al., 1999 ¹	Rumen (Ovino)	Paja: pulpa de remolacha (70:30)	0.423	0.420	-	-
Carro et al., 1999	<i>In vitro</i> (Rusitec)	Pared celular de forrajes (FND)	0.668	0.572	0.600	-
Ranilla et al., 2000 ¹	<i>In vitro</i> (botellas de cultivo)	Pared celular de forrajes (FND)	0.751	0.626	0.702	-

¹ las diferencias entre BAL y BAS en relación a N¹⁵/N son estadísticamente significativas (P<0.05)

3.3.2.3. P³²

Bucholtz et al (1973) observaron que la captación de fósforo y su incorporación a los fosfolípidos microbianos presentaban una estrecha correlación con la síntesis de proteína microbiana en el rumen, por lo que propusieron el uso de P como marcador. Posteriormente, Smith et al. (1978) propusieron una técnica basada en la incorporación de P³² a los ácidos nucleicos microbianos. Estos autores observaron que los valores obtenidos con P eran aproximadamente un 85 % de los estimados utilizando ARN como marcador, y atribuyeron esta diferencia a que el ARN sobreestimaba la síntesis microbiana debido a la presencia de pequeñas cantidades de ARN de origen alimenticio. A pesar de estos resultados, la alta energía de este isótopo hace que su manejo sea peligroso y por ello se ha utilizado mayoritariamente en estudios *in vitro* (Van Nevel et al., 1977; Merry et al., 1990). Por otra parte, su vida media es corta (catorce días) y esto hace que se disponga de un tiempo limitado para analizar las muestras de digesta y extractos microbianos.

3.3.2.4. Tierras raras

Los elementos de tierras raras como lantano (La), Samario (Sm), Cerio (Ce), Iterbio (Yb) y Disproscio, han sido investigados y usados como marcadores tanto en estudios de digestibilidad como velocidad de paso, ya que se excretan mejor y se disponen de métodos sensibles para su detección. El quelato de rutenio de tris (1, 10 fenantrolina) (Ru-pheb) ha sido considerado, como las tierras raras, con una elevada capacidad para fijarse a las partículas de materia, las ventajas que tiene como marcador son muy similares a las tierras raras, excreción cuantitativa con las heces y existencia de técnicas fiables, como así también produce cierta emigración y disociación de Ru.pheb durante la digestión y paso a través del tracto digestivo. Una de sus limitantes es que suelen tener cambios en sus características al contacto con un medio ácido, como sucede en el abomas, por lo que tienden a solubilizarse (Church, 1988; Merchen, 1993)

4. Técnicas de digestibilidad

La tecnificación experimentada por la producción animal y en especial los avances obtenidos en nutrición y alimentación animal, requieren de información cada vez más precisa y rápida respecto del valor nutritivo de los alimentos y dentro de este, de la digestibilidad (Cerde et al., 1986). El conocimiento de la digestibilidad de los alimentos es básico para establecer su valor nutritivo y, por tanto, para la formulación de raciones para los animales rumiantes. Sin embargo, la determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso laborioso y costoso, y que requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, por lo que se han propuesto distintos métodos *in vitro* para su estimación.

4.1. *In vivo*

Uno de los métodos más comunes para estimar la degradación ruminal es mediante la técnica *in vivo* (Chalupa, 1974; Broderick, 1978; Zinn et al., 1982; Broderick, 1982; Stern et al., 1982); la digestibilidad, o el contenido de energía digestible o metabolizable, generalmente se determina mediante ensayos de balance nutritivo, utilizando animales vivos. Este método, descrito por (Cerde et al., 1986) es sin duda, el que da la mejor estimación de la digestibilidad de un alimento; sin embargo, requiere mantener animales preparados quirúrgicamente, (en rumen y duodeno) lo cual no es fácil, además de que exige una serie de análisis laboriosos. Otra dificultad es la separación de la proteína microbiana con la de la dieta (Ørskov et al., 1979). Generalmente en este método, está muy difundido el uso de ovinos, aún cuando la mayoría de los alimentos para rumiantes es consumido por bovinos, sin embargo ambas especies presentan algunas diferencias con respecto a necesidades de alimentos y espacio físico (Riveros, 1986).

Esta técnica es utilizada con los alimentos que relativamente tienen altos contenidos de proteína por lo que normalmente se suele habituar al animal a la ración que queremos estudiar durante un período de tiempo suficiente para permitir la adaptación de los microorganismos del rumen y para ajustar la toma de alimentos hasta un nivel estable, algo por debajo del consumo máximo, con la finalidad de asegurar la totalidad de su consumo y reducir la variación en la medición de digestibilidad aparente en la etapa de recolección de

heces, por un efecto de arrastre del consumo ad-libitum (D' Ascanio et al., 1995; NRC, 2001).

Ventajas y desventajas

- Es un método relativamente exacto pero demora mucho tiempo, poco práctico.
- Sin duda es el que da la mejor estimación de la digestibilidad de los alimentos.
- Presenta un ligero sesgo respecto de la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces.
- Se requieren de grandes cantidades de muestras, largos periodos y su costo es elevado, ya que se requiere infraestructura especial.
- A pesar de lo real que son las evaluaciones, se producen variaciones entre determinaciones debido tanto a factores propios del animal, como de las plantas o alimentos.
- En la práctica el método presenta ciertas dificultades, como son el asegurarse de que todas las excretas sean recogidas, evitar que se mezclen con la orina, impedir que se produzcan trastornos digestivos, y otros (Lascano, 1990).
- El método directo requiere de personal para medir el consumo, recolectar las heces fecales, lo que se traduce además en un mayor tiempo y laborioso aumentando considerablemente los costos.
- Se requiere utilizar varios animales con la finalidad de eliminar las diferencias que pudieran existir de origen digestivo en individuos de la misma especie, edad, y sexo.
- Se restringe mucho la selectividad natural del animal, siendo menor el consumo que en el caso ad libitum.

4.2. *In sacco*

La técnica de la bolsa de fibra artificial, ha sido utilizada durante varios años para proporcionar valores estimados de la tasa de desaparición de los constituyentes alimenticios en el rumen (Ørskov et al., 1980). Esta técnica tiene la ventaja de dar una estimación rápida de la tasa y grado de degradación de los alimentos en el rumen, sin necesidad de ningún procedimiento complicado más que simplemente pesar. Por otra parte, se ha observado que los valores encontrados después de las 48 horas de degradación, se pueden comparar con los encontrados en la digestibilidad *in vivo* cuando se utilizan bolsas con poros

extremadamente pequeños (Huntington et al., 1995). Otra ventaja consiste en que el material alimenticio se encuentra suspendido en el rumen, estando éste en íntimo contacto con el ambiente ruminal (temperatura, pH, sustrato, buffer, enzimas, etc.) cosa que no sucede en la técnica de digestibilidad in vitro. Ørskov et al., 1980, mencionan tres limitantes en esta técnica:

- a) Al ser una muestra confinada dentro de la bolsa, no está expuesta a ninguna reducción debido a la masticación o rumia.
- b) El alimento normalmente podría salir del rumen, una vez que tuviera el tamaño adecuado.
- c) Debe recordarse que se cuantifica la reducción del material a un tamaño suficientemente pequeño para salir de la bolsa, lo que necesariamente implica una degradación completa a componentes químicos sencillos.

A pesar de lo antes señalado este método tiene varias fuentes de error; entre ellos tenemos; la dieta del animal, tamaño, tipo y diámetro de la bolsa, tamaño y peso de la muestra, número de muestras, forma de la suspensión y tiempo de permanencia de la bolsa dentro del rumen, así como su modo de extracción. Otros puntos importantes que se tienen que considerar es la necesidad de animales canulados, la limitación en el número de muestras a procesar por el animal canulado, y los costos asociados, son las principales razones por las que esta técnica solo se emplea en centros de investigación y no resulta rentable para laboratorios de servicios. Todo esto hace que su estandarización sea laboriosa y que sin un adecuado trabajo sistémico la variación en los resultados sea grande. No obstante esta variante, es muy útil, sobre todo en aquellos casos en que la cantidad de muestra analizada es numerosa, como es el caso de los programas de mejora genética de pastos (Burton, 1970).

Esta técnica ha mostrado un buen grado de asociación con el consumo y la digestibilidad para alimentos como forrajes frescos y henos (Ørskov, 2000). En el caso de ensilajes y de maíz, es necesario realizar algunas modificaciones a la técnica (ej. Incubar material fresco y picado en reemplazo de seco y molido) para garantizar la veracidad de los

resultados obtenidos. Por otra parte Vanzant et al. (1998) (**Cuadro 7**) sugieren ciertos procedimientos para estandarizar las determinaciones *in situ*:

Cuadro 7. Estandarización en las determinaciones *in situ*.

Concepto	Recomendación
Dieta:	
Tipo	60 a 70% de forraje
Nivel de alimentación	Mantenimiento
Frecuencia de alimentación	> 2 veces/día
Bolsa:	
Material	Polyester
Tamaño de poro	40 a 60 μm
Tamaño de muestra: área de superficie	10mg/cm ²
Procesamiento de la muestra:	
Repeticiones:	
Número de animales	> 2
Número de días	> 2
Número de bolsas	> 1
Enjuague	Mecánico (5 veces 1 min./enjuague)
Corrección microbiana	si
Modelo matemático	Simple, disponible y adecuado para describir los datos
Substrato estándar	Si

4.3. *In vitro* (producción de gas)

Las técnicas *in vitro* más comúnmente utilizadas en la evolución de la digestibilidad de alimentos para rumiantes, se basan en la incubación de la muestra durante cierto tiempo en un frasco con líquido ruminal en un medio anaerobio y tamponizado. Uno de estos métodos es el de digestibilidad *in vitro* que, de acuerdo a un gran número de trabajos, predice digestibilidad *in vivo* con alto grado de precisión (Lascano, 1990). Smith, (1971) indica

que, las posibilidad de imitar las reacciones que ocurren a nivel ruminal son la base de las técnicas *in vitro* desarrolladas por los científicos desde los años sesenta.

La técnica de producción de gases evalúa la degradación del alimento midiendo el volumen del gas generado durante la fermentación (Theodorou et al 1994) para lo cual se utilizan jeringas de vidrio o transductores de presión. Se han desarrollado sistemas semiautomáticos y sistemas automáticos para el trabajo de esta técnica en el laboratorio (Posada et al., 2005a). Uno de los problemas más importantes en la aplicación de esta técnica es el hecho de que la cantidad de gas producido depende de la proporción molar los ácidos grasos volátiles producidos durante el proceso de fermentación (Stern et al 1997). Por ello algunos autores (Schofield et al., 1995) sugieren que es necesario monitorear la proporción de estos ácidos grasos para corregir estas diferencias. Aunque la evaluación *in vitro* de los forrajes mediante el uso de inóculos de microorganismos ruminales presenta probablemente el mejor cálculo hecho en laboratorio sobre la digestibilidad *in vivo*, los ensayos *in vitro* requieren una fuente uniforme y confiable de inóculo ruminal que a menudo es difícil de obtener, además de la variabilidad del inóculo (Arce et al 2003). De allí que los métodos de fermentación en cultivo continuo se constituyan en una alternativa a los métodos sin intercambio de sólidos y líquidos como el de Tilley y Terry (1963) y el de Van Soest et al. (1966). Estos sistemas simulan el ambiente ruminal y también se basan en el uso de inóculos ruminales que, en este caso, son mantenidos mediante el bombeo continuo de una solución tampón. El flujo del líquido se establece por su salida a través de un filtro. El material sólido se administra en dosis repartidas en el tiempo (Hoover et al 1976; Teather et al., 1988) o mediante introducción escalonada en bolsas de nylon, como en el Rusitec (Czerkawski et al., 1977). Las ventajas de estos sistemas residen en su bajo costo y menor variación entre las unidades experimentales. Adicionalmente, no se presentan dificultades por la presencia de fuentes endógenas como en las pruebas *in vivo*, y el flujo de la digesta es medido directamente (Stern et al 1997).

4.4. *In vitro* (Incubador Daisy)

La búsqueda para hacer más eficiente, rápido y económico el proceso para estimar la digestibilidad ha llevado al desarrollo del método *in vitro* de Goering y Van Soest (1979),

utilizando el sistema Daisy^{II}® (**Figura 6**; ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU) el cual se utiliza como método alternativo para calcular la degradación del alimento en el rumen en condiciones de laboratorio permitiendo la incubación simultánea de hasta 100 muestras diferentes, distribuidas en 4 jarras (**Figura 7**), con una capacidad de hasta 4 L cada una, dentro de una cámara aislada con temperatura controlada (39°C; **Figura 8**) donde se mantiene el calor uniforme y una agitación constante durante el procedimiento de incubación que pueden ser hasta 25 muestras que están en contacto con una solución tampón y líquido ruminal. Las muestras son incubadas en bolsas de poliéster/ polietileno y se asume que el material que desaparece de la bolsa es digerido. Diferentes autores reportan que las predicciones de digestibilidad aparente y verdadera realizadas por este sistema son relativamente precisas (De Figueiredo et al., 2000; Julier et al 1999; Mabjeesh et al., 2000; Vogel et al 1999). Por otra parte, Mould et al. (1998) adaptaron esta técnica para estimar además la tasa de degradación de la materia seca y otras fracciones de los alimentos, retirando bolsas de los frascos a diferentes tiempos de incubación. Esta modificación ha sido adoptada con éxito para evaluar el efecto de aditivos enzimáticos en alfalfa (Colombatto 2000). Es un método rápido, seguro, eficiente y económico (De Figueiredo et al., 2000) y los datos obtenidos de digestibilidad para distintos alimentos, tienen una alta correlación con los obtenidos por el método convencional de Tilley y Terry (1963) (Vogel et al., 1999) y con la técnica *in situ* o de la bolsa de nylon (Robinson et al., 1999; Varel et al., 1995; Wilman et al. 2000). El principio del Daisy consiste en establecer condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*, de tal manera que el procedimiento incluye soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso (Holden, 1999).



Figura 6. Incubador Daisy (Anlom Technology).



Figura 7. Jarras con soluciones preparadas de acuerdo a ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU.



Figura 8. Jarras digestoras dentro del incubador Daisy con temperatura controlada.

BIBLIOGRAFIA.

- AFRC (1993). Technical Committee on responses to nutrients. Report N° 9. Nutritive Requirements of Ruminant Animals: Protein Nutrition Abstracts & Reviews, Ser. B, 62: 787-835.
- AFRC (1995). Technical Committee on responses to nutrients. Report N° 9. Nutritive Requirements of Ruminant Animals: Protein Nutrition Abstracts & Reviews, Ser. B, 62: 787-835.
- Akin, D. E. and Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1117-1125.
- Akin, D. E. and Rigsby, L. L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1987 -1995.
- Akin, D. E.; Gordon, G. L. R. and Hogan, J. P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 738- 748.
- Aldrich J. M, Muller L D. and Varga G. A. 1993 Non structural carbohydrate and proteins effects on rumen fermentation, nutrient flow and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 1091-1105.
- Amstrong, D.G., Smithard, R.R. 1979. The fate of carbohydrates in the small and large intestines of the ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 38: 283.
- Ankom Technology Procedures for fiber and *in vitro* analysis. [consultada: 16 noviembre, 2004]. URL: [hpt://www.ankom.com/homepage.html](http://www.ankom.com/homepage.html).
- Anzola, V. H., M. A. Laredo, M. E. Alacón, F. Gómez. 1981. Consumo voluntario de tres variedades de raigrás en pastoreo por ovinos, mediante el uso de óxido de cromo. *Rev. ICA.* 16(1) :11 - 19.
- Arambel, M. J., Bartley, E. E., Dufva, G. S., Nagaraja, T. G. and Dayton, A. D. 1982. Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.*, 65, 2095-2101.

- Araújo, K. V., Lima, J. A. F., Fialho, E. T. and Miyagi, E. S. 2000. Comparação dos indicadores internos com métodos de coleta total para determinar a digestibilidade dos nutrientes de dietas mistas em equinos. *Ciênc Agrotec.* 24: 1041 – 1048.
- Arce, C., Arbaiza, T., Carcelén, F. y Lucas, O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev Inv Vet Perú*; 14 (1): 7-12
- Archimède, H., Sauvant, D. and Schnidely, P. 1997 Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reproduction Nutrition Developed.* 37: 173 – 189.
- Asocras, 2000. Digestive Anatomy in Ruminants. Disponible en: <http://www.calfnotes.com>. En línea: Mayo 2001. Consultado Octubre 2012.
- Avances en Producción Animal, 11, (1- 2), 3 - 25
- Balcells, J., Guada, J. A., Castrillo, C. and Gasa, J. 1991. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci., Camb.*, 116, 309-317.
- Balcells, J., Guada, J. A., Cstrillo, C. and Gasa, J. 1991. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *Journal Agriculture Science Cambridge.* 116: 309-317.
- Balcells, J., Guada, J.A., Peiro', J.M., Parker, D.S., 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575, 153–157.
- Baldwin, R. and Allison, M. 1983. Rumen metabolism. *Journal Animal Science.* 57 (Supp. 2): 461 - 477.
- Barichievich, E. M. and Calza, R. E. 1990. Media carbon induction of extracellular cellulase activities in *Neocallimastix frontalis* isolate EB-188. *Current Microbiol.* 20: 265-271.
- Barthiaux-Thill, N. and Oger, R. 1986. The indirect estimation of the digestibility in cattle herbage from Belgium permanent pasture. *Grass and Forage Science.* 41: 269 – 272.

- Basurto, R. e I. Tejada de Hernández. 1992. Digestibilidad aparente de la pulpa deshidratada de limón. Comparación de métodos para estimarla. *Téc. Pec. Méx.* 30(1):13 - 22.
- Bates, D. B., Gillett, J. A., Barao, S. A. and Berger, W. G. 1985. The effect of specific growth rate and stage of growth on nucleic acid-protein values of pure cultures and mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, 61, 713-724.
- Bauchop T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environment*. 6: 339-348.
- Bauchop, T. 1979a. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 148-158.
- Bauchop, T. 1979b. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann. Rech. Vét.* 10: 246-248.
- Bauman, D. E., McCutcheon, S. N., Steinhour, W. D., Eppard, P. J. and Sechen, S. J. 1985. Sources of variation and prospects for improvement of productive efficiency in the dairy cow: a review. *Journal of Animal Science*. 60:583-592.
- Beckers, Y., Théwis, A., Maudoux, B. and Francois, E., 1995. Studies on the in situ nitrogen degradability corrected for bacterial contamination of concentrate feeds in steers. *Journal of Animal Science*. 73: 220-227.
- Beever, D. E. 1993. Rumen function. Pages 187 – 215 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes, J. M. and France, J. (eds). CAB International, London and NY.
- Beever, D. E. and Cottrill B. R. 1994. Protein for system feeding ruminant livestock. A European assessment. *Journal of Dairy Science*. 77: 2031-2043.
- Beever, D. E., Harrison, D. G. Thompson, J. B. Cammell, S. B. and Osbourn, D. F. 1974. A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. *British Journal of Nutrition*. 32: 99 – 112.

- Berchielli, T. T., Rodriguez, N. M., Neto, E. O. and Rocha, S. S. 1998. Comparação de marcadores de fase sólida para medir fluxo da materia seca e matéria organica no duodeno. Arq. Bras. Med Vet. Zootec. 50:147 – 152.
- Blümmel, M., Steingas, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed in take of roughages. British Journal of Nutrition. 77: 911-921.
- Bondi, A. A. 1989. Nutrición Animal. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. Pp.546.
- Boval, M., Peyraud, J. L., Xandé, A., Aumont, G., Coppry, O. and Saminadin, G. 1996. Evaluation d'indicaterus fecauxpour la prediction de la digistibilite et quantites ingeree de Dichantium sp. Par bovins creoles en guadeloupe. Annales Zootechnique. 45: 121 – 134.
- Broderick, G. A. 1978. In vitro procedures for estimating rates of ruminal protein degradation and proportions of protein escaping the rumen undegraded. Journal of Nutrition. 108 – 181.
- Broderick, G. A. 1982. Estimationsof protein degradation using *in situ* and *in vitro* methods. In: Owens, F. N. editors. Protein Requirements for cattle: Proc. International Symposium. Stillwater. Okla. Division of Agriculture, Oklahoma State University. MP – 109: 72.
- Broderick, G. A. and Merchen N. R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. Journal of Dairy Science. 75: 2618 – 2632.
- Broderick, G. A., Wallace, R. J. and Ørskov, E. R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. En: “Physiologic aspects of digestion and metabolism in ruminants” Eds: T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima. Academic Press. USA. Pp. 541-592.
- Brodiscou, L. and Jouany, P. J. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. Reproduction and Nutrition Developed. 35: 517 – 535.

- Bucholtz, H. F. and Bergen, W. G. 1973. Microbial phospholipid synthesis as a marker for microbial protein synthesis in the rumen. *Appl. Microbiol.*, 25, 504-509.
- Burns, J. C. Pond, K. R. and Fisher, D. S. 1994. Measurement of forage intake. In: Fahey Jr. G. C. Forage quality, evaluation and utilization. Lincoln: University of Nebraska. Pp: 494 – 531.
- Burton, G. W. 1970. Proc. XI Int. Grassld Congress. Pp. 56 Castellanos R. A., Llamas, L. G. y Shimada, A. 1990. Manual de técnicas de investigación en ruminología. Sistema de Producción Continua en Producción Animal en México, A. C. México, 1990.
- Buttery, P. J. and Lewis, D. 1992. Nitrogen metabolism in the rumen. En: “Forege protein in ruminant animal production” An occasional public Br. Soc. Of aAnimal Production N° 6: 1 – 11.
- Calsamiglia, S., Stern, M. D. and Firkins, J. L. 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, 74, 1375-1381.
- Cameron, E. A. and Peyraud, J. L. 1993. Prediction of herbage ingested by dairy cows. *Revista Argentina Produccion Animal.* 13: 23 – 30.
- Carro, M. D. and Lebzien, P. and Rohr, K., 1992a. Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. *Livest. Prod. Sci.*, 32, 219-229.
- Carro, M. D. and Miller, E. L. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition.* 82: 149-157. 15
- Carro, M. D. and Miller, E. L. 2001. Comparison of bacterial isolates and of microbial markers (15N and purine bases) for the determination of microbial protein synthesis in semicontinuous fermenters. *J. Anim. Sci.* (En fase de evaluación).
- Carro, M. D., Lebzien, P. and Rohr, K., 1992b. Influence of yeast culture on the «in vitro» fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 37, 209-220.

- Carro, M. D., Miller, E. L. 1999. Comparison of ^{15}N and purines as microbial markers in a RUSITEC system. In: Proceedings of the BSAS Winter Meeting 1999, BSAS, Pp. 214.
- Carro, M. D. and Miller, E. L., 1998. Effect of microbial isolates on microbial yield estimation in RUSITEC system. In: *In vitro* Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants. ed. BSAS, Midlothian, pp. 306-308, Reino Unido.
- Castrillo C., Lainez M., Gasa J. and Guada J. A. 1992. The Effect of Increasing the Proportion of Barley Straw in Pelleted Concentrate Diets Given to Lambs on Rumen Outflow Rate and Degradation of Protein Supplements. *Animal Production* 54, 59-66.
- Cecava, M. J. Merchen, N. R. Gay, L. C. and Berger, L. L. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *Journal of Dairy Science*. 73: 2480 – 2488.
- Cerda, D.A.; Manterola, H.; Sirhab L., 1986. Validación y Estudios Comparativos de Métodos Estimadores de la Digestibilidad Aparente de Alimentos para Rumiantes. *Avances en Producción Animal* N° 11 (1-2); 53 -62.
- Chalupa, W. 1974. Rumen by-pass and protection of proteins and amino acids. *Journal of Dairy Science*. 58: 1198.
- Chaney AL, Marbach EP. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinica Chemistry* 8, 130 – 132.
- Chen X B and Gomes M J 1995 Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, UK. p. 1-21
- Chen, G., Russell, B. J., Sniffen, J. C. 1987. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate step in ruminal protein degradation. *Journal of Dairy Science*. 170: 1211 – 1219.
- Chen, X. B., Chen, Y. K., Franklin, M. F., Ørskov, E. R. and Shand, W. J. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *Journal of Animal Science*. 70: 1534-1542.

- Chen, X. B., Hovell, F. D. DEB. and Ørskov, E. R. 1990a. Excretion of purine derivatives in ruminants: recycling of allantoin into the rumen via saliva and its fate in the gut. *British Journal of Nutrition*. 63: 197-205.
- Chen, X. B., Hovell, F. D. DEB., Ørskov, E. R. and Brown, D. S. 1990b. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition*. 63: 131-142.
- Chen, X. B., Ørskov, E. R. and Hovell, F. D. DEB. 1991. The use of intragastric infusion in studies on excretion of purine derivatives as a measure of microbial protein supply in ruminants. In: *Protein Metabolism and Nutrition*, Vol. 2. Eggum, B.O., Boisen, S., Børsting, C., Danfaer, A. and Hvelplund, R., eds. National Institute of Animal Science, Foulum, Pp. 67-70. Dinamarca.
- Cheng, K. J. And Costerton, W. J. 1980. Adherent rumen bacteria, their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. Pp. 227 – 250. En: *Digestive physiology metabolism in ruminants*. Ruckebush, Y. And Thivend, P., Eds. MTP Press, Lyncaster.
- Church C. D. 1988. *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. 1ª Edición. Ed. Acribia
- Clark, J. H. 1975. Nitrogen metabolism in ruminants: protein solubility and rumen bypass of protein and amino acids. En: *Protein nutritional quality foods and feeds*. Ed. Friedman M. Marcell Decker, Inc. NY. Vol. 1: 261.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H. and Cameron, M. R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 75: 2404 – 2323.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H. and Cameron, M. R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75: 2304-2323.
- Colombatto D 2000 PhD Thesis, The University of Reading UK.
- Corona L., Rodriguez S., Ware R. A., and Zinn R. A., 2005. Comparative effects of whole, ground, dry-rolled, and steam-flaked corn on digestion and growth performance in feedlot cattle. *The Professional Animal Scientist* 21:200–206

- Cotta, M. A., Hespell, B. R. 1986. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. Pp. 121 – 136 en: control of digestion and metabolism in ruminants. L. P. Milligan, W. L. Grovum and A. Dobson, Eds. Prentice – Hall. Englewood cliffs, New Jersey.
- Crampton, E. W. and Harris, L. E. 1969 applied Animal Nutrition. 2nd edition. Freeman, W. H. and COMPANY. San Francisco. Pp: 753.
- Crawford, R. J., Hoover, W. H. and Junkins, L. L. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentations in continuous cultures. II. Nitrogen partition and efficiency of microbial synthesis. Journal of Animal Science. 51 (4): 975.
- Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen. Simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition. 38: 371-384.
- Czerkawski J. W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press Ltd. Oxford, England.
- Czerkawski J. W., Breckenridge, G. 1982. Distribution and changes in urease (EC 3.5.1.5.) activity in rumen simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition. 47, 331 – 348.
- D'Ascanio 1995. Estudio Dirigido. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- De Figueiredo, M., Mbhele, A., Zondi, J. A. 2000. A modification of the Daisy -200 technique for the determination of *in vitro* dry matter digestibility. South Africa Journal of Animal Science. Suppl. 1: 49-50.
- Dearriba, J. 1988. Fisiología y bioquímica de la digestión en el rumiante. Editorial Oriente. Santiago de Cuba. p 83.
- Dehority, B. A. 1995. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. In: Proceedings of the International Symposium on the Nutrition Requirements of Ruminants, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa-MG-Brasil. Pp. 121-137.
- Demeyer, D. I. 1981. Introductory lecture: rumen microbes and digestion of plant cell walls. Agriculture and Environment. 6: 295-337.
- Dewhurst, R. J. Davues, D. R. and Merry, R. J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. Animal Feed Science and Technology. 85: 1 – 21.

- Dijkstra, J., France, J. and Davies, R. D. 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 81: 3370 – 3384.
- Dijkstra, J., Forbes J. M and France J. 2005. Quantitative aspects of ruminant and metabolism. 2nd edition. CAB International.
- Doré, J. and Gouet, Ph. 1991. Microbial interactions in the rumen. En: rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Ed Jouany, J. P. INRA editions. Paris.
- Dove, H., Milne, J. A. and Mayes, R. W. 1990. Comparison of herbage intakes estimated from in vitro or n-alkane based digestibility's. En: Proceedings New Zealand Society of Animal Production. 50: 457 – 459.
- Dove, H., Siever-Kelly, C., Leury, D. J. Gatford, K. L. and Simpson, R. J. 1992. Using plant wax alkanes to quantify the intake of plant parts by grazing animals. En: Proceedings of the Nutrition Society of Australia. 17: 149.
- Eliman, M. E. . and Ørskov, E. R. 1985. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen 3. Effects of feeding intake or water inducted by the addition of sodium chloride and the particle size of protein supplements. *Animal Production*. 40: 309 – 313.
- Eliman, M. E. and Ørskov, E. R. 1984. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen. *Animal Production*. 38: 45 – 51.
- Elizalde J. C., Merchen N. R. and Faulkner D. B. 1999. Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber and starch. *J. Anim. Sci.* 77:457-466.
- Ellis, W.C., and Pfander, W. H. 1965. Rumen microbial polynucleotide synthesis and its possible role in ruminant nitrogen synthesis. *Nature (Lond.)*. 205: 974-975.
- Erfle, J. D., Boila, R. J., Teather, R. M., Mahadevan, S. and Saurer, F. D. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganism in vitro. *Journal of Dairy Science*. 65: 1457 – 1514.
- Erfle, J. D., Sauer, D. F. and Mahadevan, S. 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of ammonio acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 60: 1064 – 1072.

- Ezequiel, J. M. B., Mendes, A. R. and Silva, L. D. F. 1999. Estimativa da digestibilidade através da FDN indigestível de rações contendo dois níveis de casca de soja e diferentes fontes protéicas em novilhos mestiços. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia- Porto alegre, 36. NUR 130.
- Fahey, G. C. and Jung, H. G. 1983. Lignin as marker in digestion studies: A review. *Journal of Animal Science*. 57: 220 - 225
- Fahey, G. C., G. A. McLaren and J. E. Williams. 1979. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. *Journal of. Animal Science*. 48: 941 - 946.
- Faichney, G. J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. McDonald I.W., Warner A.C.I. eds. Armidale University of New England Publishing Unit, pp. 277-291.
- Faichney, G. J. 1993. Digesta flow. Pp. 53 – 85 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes M. J. and France J. CAB International, London and NY.
- Fengel, D., Wegner, G. Wood, 1984. *Ultrastructure reactions*. New York: Waster and Grugter. Pp. 613.
- Ferguson, J. D. and Chalupa, W. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of. Dairy Science*. 72: 746-766.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Nutrition*. 126: 1347 – 1354.
- Firkins, J. L., Allen, S. M., Oldick, S. B. and St – Pierre, R. N. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *Journal of Dairy Science*. 81: 3350 – 3369.
- Firkins, J. L., Berger, L. L., Merchen, N. R., Fahey, G. C. JR. and Mulvaney, R. L., 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *Journal of Dairy Science*. 70: 2302-2311.
- Fonty, G and K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. pp. 655-679. In:

- Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (eds.). Academic Press, San Diego.
- Fonty, G.; Grenet, E.; Févre, M.; Breton, A. and Gouet, Ph. 1988. Ecology and functions of rumen anaerobic fungi. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28: 1-18.
- Forrest, W. W. and Walker D. J. 1971. *Advances in microbial physiology*. 1ª Edicion, Academic Press. 5: 213-274.
- Forsberg, C. W., Lovelock, A. L., Krumholz, L. and Buchanan-Smith, G. J. 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environment Microbiology*. 121: 105 – 119.
- France, J. and Dijkstra, J. 1993. *Quantitative Aspects of ruminan digestion and metabolism*. Pp. 158.
- Franzolin, R. and Siddons, R. C. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentration. *Journal of Animal Science*. 74, 2803 – 2809.
- Fukushima, R. S., Hatfield, D. R. 2003. Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. *Pesq Agropec Bras*. 38: 373 – 378.
- Funaba, M, Kagiya K, Iriki T and Abe M 1997 Duodenal flow of microbial nitrogen estimated from urinary excretion of purine derivatives in calves after early weaning. *Journal Animal Science*. 75: 1965-73.
- Ganev, G., Ørskov, E. R., and Smarth, R. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *Journal Agricultural Science, Cambridge*. 93: 651 – 656.
- Giesecke, D., Ehrentreich, L., Stangassinger, M. and Ahrens, F. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77: 2376-2380.
- Goering H K. and Van Soest P J. 1979. Forage fiber analysis. *Agriculture Handbook No. 379*, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C.
- Gordon, G. L. R. 1985. The potential manipulation of rumen fungi. In *Reviews in Rural Science*, Ed. Leng, R. A.; Barker, J. S. F.; Adams, D. B.; Hutchinson, K. J. Vol. 6: 124-128, Armidale, Australia: University of New England, publications Office.

- Gordon, L. R. and Phillips, M. W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1703-1710.
- Greenhalgh, J. F. D. and Corbett, J. L. 1960. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. 1. Nitrogen and chromagen as fecal substance. *Journal of Agricultural Science, Cambridge.* 55: 371 – 376.
- Grenet, E.; Breton, A.; Fonty, G.; Barry, P. and Remond, B. 1988. Influence of the diet on rumen anaerobic fungi. *Reprod. Nutr. Develop.* 28: 127 -128.
- Harrison, D.G. and McAllan, A. B. 1980. Factors affecting microbial growth yield in the reticulo-rumen. En: "Digestive, physiology and metabolism in ruminants" Ed: Y. Ruckerbush, P. Thivend. MTP Press, Lancaster, England. Pp.: 205 – 226.
- Hebraud, M. and Fèvre, M. 1988. Characterization of hydrolases produced by rumen anaerobic fungi. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28: 131-132.
- Hegarty, M. P. and Peterson, P. J. 1973. Free amino acids, amines and ureides. Pp. 2 – 62. En: chemistry and biochemistry of herbage. Butler, G. W. and Bailey, R. W. Eds. Academy Press, London and NY.
- Hespell, R. B. and Bryant, M. P. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP} . *Journal Animal Science.* 49: 1641 – 1659.
- Hino, T and Russell, B. J. 1985. Effect of reducing – equivalent disposal and NADH/NAD on determination of amino acids by intact rumen microorganism and their cell extract. *Appl. Environment Microbiology.* 50: 168 – 1374.
- Hino, T. and Russell, J. 1987. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. *Journal of Animal Science.* 1987. 64: 261 – 270.
- Hobson, P. N. and Jouany, J. P. 1988 Models, mathematical and biological, of the rumen function. En: the rumen microbial ecosystem. Ed. Hobson, P. N. Elsevier Science Publishers. Ltd. NY.

- Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*. 82: 1792 – 1794.
- Hollingsworth, K. J., D. C. Adams, J. J. Klopfenstein, J. Lamb and G. Villalobos. 1995. Supplement and forage effects on fecal output estimates from an intra-ruminal marker device. *J. Range Manage.* 48:137 - 140.
- Hoover W. H., Crooker B. A. and Sniffen C. J. 1976. Effects of differential solid liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43: 528-534
- Hoover, W.H. and Stokes, S.R. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial Yield. *Journal Dairy Science*. 74, 3630
- Hristov A. N. 2007. Comparative characterization of reticular and duodenal digesta and possibilities of estimating microbial outflow from the rumen based on reticular sampling in dairy cows. *J Anim Sci* 2007.85:2606-2613.
- Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes*. Ed: Academic Press. London.
- Huntington, J. A. and Givens, D. I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds a review of the procedure. *Nutrition Abstract Revision*. 65: 64 – 93.
- Jouany, J. P., Broudicou, L., Prins, R. A. and Komisarczuk-Bony, S. 1995. Metabolisme et nutrition de la population microbienne del rumen. Pp. 349-381 in *Nutrition des Ruminants Domestiques*. Jarrige, R., Ruckebush, C., Demarquilly, M. H. Farce, and Jounet, M. INRA. Paris, France.
- Julier, B., Lila, M., Furstoss, V., Travers, V. and Huyghe, C. 1999. Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. *Animal Feed Science and Technology* 79. 239-245
- Kennedy, P. M. and Milligan, L. P. 1980. The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: a review. *Can J Anim. Sci* 60: 205-221.
- Kennedy, P.M., Hazlewood, G.P., Milligan, L.P. 1984. A comparison of methods for the estimation of the proportion of microbial nitrogen in duodenal digesta, and of correction for microbial contamination in nylon bags incubated in the rumen of sheep. *British Journal of Nutrition*. 52, 403-417.

- Komisarczuk, S., Durand, M., Beaumatin, P. H. and Hannequart, G., 1987. Utilisation de l'azote 15 pour la mesure de la protéosynthèse microbienne dans les phases solide et liquide d'un fermenteur semi-continu (Rusitec). *Reprod. Nutr. Develop.*, 27 (1B), 261-262.
- Kopeóny, J. and Williams, A. 1988. G.Synergism of rumen microbial hydrolases during degradation of plant polymers. *Folia Microbio.* 33: 208-212.
- Kotb, A. R. and T. D. Luckey. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews.* 42: 813 - 845.
- Lancaster, R. J. 1947. Estimation of digestibility of grazed pasture from faeces nitrogen. *Nature.* 163: 330.
- Langlands, J. P. 1975. Techniques for estimating nutrient intake and its utilization by the grazing ruminant. En: McDonald, I. W. and Warner, A. C. I. (eds.). *digestion and metabolism in the ruminant.* University of New England, Armidale, Australia, Pp. 320 – 332.
- Laredo, M. A., H. J. Anzola V. y F. Segura. 1988. Cloruro de iterbio y óxido de cromo como indicadores de excreción fecal y consumo de heno. *Rev. ICA.* 23:303 - 313.
- Lascano, C. E. 1990. Recomendaciones sobre Metodología para la Medición de Consumo y Digestibilidad "in vivo". In: M. Ruix y A. Ruiz (De), *Nutrición de Rumiantes: Guía metodológica de investigación.* ALPA, San José, Costa Rica.
- Lebzien, P., Giesecke, D., Wiesmayr, S. and Rohr, K. 1993. Messung der mikrobiellen Proteinsynthese im Pansen von Kühen mittels 15 N-Bestimmung im Doudenalchymus und Allantoinausscheidung in der Milch. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition.* 70: 82-882.
- Legay-Carmier, F. and Bauchart, D. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *British Journal of Nutrition.* 61: 725-740.
- Ling, J. R. and Buttery, P. J. 1978. The simultaneous use of ribonucleic acid, 35 S, 2, 6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers of microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *British Journal of Nutrition.* 39: 165-179.
- Lippke, H., Ellis, WC., Jacobs, BF., 1986. Recovery of Indigestible Fiber from Feces of Sheep and Cattle on Forage Diets. *Journal of Dairy Science.* 69(2): 403.

- Loerch, S. C., berger, L. L., Plegge, S. D. and Fahey, G. C. 1983. Effect of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *Journal of Animal Science*. 56: 206 – 216.
- Lopes, F. C. F. Rodríguez, N. M. y Aroeira, L. J. M. 2001. Uso dos n-alcanos em estimativas de consumo de ruminantes sob pastejo *Vet. Noticias*. 7: 165 – 175.
- Lowe, S. E.; Theodorou, M. K. and Trinci, A. P. J. 1987. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperatura on development. *Appi. Environ. Microbio*. 53: 1210-1215.
- Luginbuhl, J. M., Pond, M. K., and Burns, C. J. 1990. Changes in ruminal and fecal particle weight distribution of steers feed coastal bermudagrass hayat four levels. *Journal of Animal Science*. 68: 2864 – 2873.
- Mabjeesh, S., Cohen, M., Arieli, A.2000. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *Journal of Dairy Science*; 83: 2289-2294.
- Mahadevan, S. Erfle, J. D. and Saurer, F. D. 1979. A colorimetric method for determination of proteolytic degradation of feed proteins by rumen microorganism. *Journal of Animal Science*. 48: 947 – 953.
- Mahadevan, S. Erfle, J. D. and Saurer, F. D. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by bacteroides amylophilus protease and by rumen microorganism. *Journal of Animal Science*. 50: 723 – 728.
- Makkar H. P. S. and Becker K. 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *British Journal of Nutrition*. 81: 107-112.
- Martin, C., Williams, A. G. and Michalet-Doreau, B. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *Journal of Animal Science*. 72, 2962-2968.
- Martín-Orúe, S. M., Balcells, J., Zakraoui, F., Castrillo, C. 1998. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Animal Feed Science and Technology* 71: 269–282.

- Mayes, R. W., Lamb, C. S. and Colgrove, P. M. 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *Journal of Agricultural Science*. 107: 161 – 170.
- Mayes, R. W., Lamb, C. S. and Colgrove, P. M. 1988. Digestion and metabolism of dosed evenchain and herbage odd-chain n-alkanes in sheep. En: *Proceedings 12 th General Meetings of the European Grassland Federation*. Pp. 159 – 163.
- Mayes, R.W., and H. Dove. 2000. Measurement of dietary intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutr. Res. Rev.* 13:107-138.
- McAllan, A. B. and Smith, R. H. 1973a. Degradation of nucleic acids in the rumen. *British Journal of Nutrition*. 29: 331-345.
- McAllan, A. B. 1982. The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 41: 309-317.
- McAllan, A. B. and Smith, R. H. 1983. Estimation of flows of organic matter and nitrogen components in post-ruminal digesta and effects of level of dietary intake and physical form of protein supplement such estimates. *British Journal of Nutrition*. 49:119.
- McAllister, T. A., Phillippe, C. R., Rode, M. L. and Cheng, J. K. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*. 71: 205 – 212.
- McAllister, T. A., Rhode, L. M. Cheng, K. J. and Buchanan-Smith, J. G. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain. *Canadian Journal Animal Science*. 70: 571 – 579.
- McAllister, T. A., Bae, H. D. Jones, G. A. and Cheng, K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion on the rumen. *Journal Animal Science*. 72: 3004 – 3018.
- McCarthy J. 1974. El uso de HCl en ceniza insoluble como un material indicador para determinar digestibilidad con cerdos. Canada: *Journal of Animal Science*. 54- 107.
- Merchen, N. R. 1993. Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: D. C. Church (Ed.). *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. Tomo I. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 191 - 223.
- Merchen, N. R. and Satter, L. D. 1983 changes nitrogenous compounds and sites of digestion of alfalfa harvested at different moisture contents. *Journal of Animal Science*. 66: 789 – 801.

- Merry, R. J. McAllan, A. B. and Smith, R. H. 1990. In vitro continuous culture studies on the effect of nitrogen source on rumen microbial growth and fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 31, 55-64.
- Merry, R.J., McAllan, A.B. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *British Journal of Nutrition*. 50: 701-709.
- Mojica, J.R. 1993. Estandarización del método *Roll Tube* para el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias ruminales. Tesis; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Pp. 1-138.
- Mould, F. L. and Nordheim, H. 1998. British Society of Animal Science. *British Society of Animal Science*, Reading, UK 22: 329-331
- Mountfort, D. O. and Asher, R. A. 1985. Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1314-1322.
- Mountfort, D. O.; Asher, R. A. and Bauchop, T. 1982. Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Environ. Microbio.* 44: 128-134.
- Muntifering, R. B. 1982. Evaluation of various lignin assays for determining ruminal digestion of roughages by lambs. *J. Anim. Sci.* 55: 432 - 438.
- National Research Council. 1985. *Ruminant Nitrogen Usage*. Washington, DC.
- National Research Council. Nutrient requirement of beef cattle, 7th ed. Washington (DC): National Academy Press, 1996.
- National Research Council. Nutrient requirement of beef cattle, 7th ed. Washington (DC): National Academy Press, 2001.
- Nocek, J. E. and Russell, J. B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*. 71: 2070 – 2107.

- Nocek, J. E. and Tamminga, S. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3598 – 3629.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen Kinetics. Pp. 123 – 145. In: *Quantitative of ruminant digestion and metabolism*. Forbes, M. J. and France, J. Eds. CAB. International. Wallingford. Oxon. UK.
- Nolan, J. V. and Leng, A. R. 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *British Journal of Nutrition*. 27: 177 – 194.
- Nozière, P. and Michalet-Doreau, B. 1997 effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganism. *Journal Science Food and Agriculture*. 73:471 – 476.
- Obispo, N. E. and Dehority, B. A. 1999 Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*. 77: 3084-95.
- Oldham, J. D. and Ling, J. R. 1977. Measurement of the rate of flow of dry matter in digesta passing through the duodenum of sheep. *British Journal of Nutrition*. 37: 333 – 343.
- Orpin C.G. and Joblin K. N. 1988. The rumen anaerobic fungi. In *the rumen microbial ecosystems*. Ed. P. N. Hobson. pp. 129-150.
- Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91: 249-262.
- Orpin, C. G. 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 94: 270-280.
- Orpin, C. G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J Gen. Microbio.* 98: 423- 430.
- Orpin, C. G. 1978. Carbohydrate fermentation in a defined medium by the rumen Phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Society for General Microbiology: Proceedings* 5: 98-99.
- Orpin, C. G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology* 10: 121-143.
- Orpin, C. G. and Hart, Y. 1980. Digestion of plant Narices by rumen Phycomycete fungi. *J. Appl. Bacteriol.* 49

- Orpin, C. G. and Letcher, A. J. 1979. Utilization of cellulose, starch, xyian, and other hemicelluloses for growth by the rumen Phycomycete *Neocallímastix frontalis*. *Current Microbiology* 3: 121-124.
- Ørscok, E. R. Hovell, F. D., De, B. and Mould, F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical*. 5: 195 – 213.
- Ørskov E. R. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92: 499 – 503.
- Ørskov E. R. 1982. Protein nutrition in ruminants. Academic Press. London.
- Ørskov E.R., Macleod N.A. and Kyle D.J. 1986. Flow of nitrogen from the rumen and abomasum in cattle and sheep given protein-free nutrients by intragastric infusion. *Br. J. Nutr.* 56:241.
- Ørskov, E. R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 24 – 28. Oval Road, London NW1 7DX, UK.
- Ørskov, E. R. 2000. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. Pp. 175 – 188. In forage evaluation in ruminant nutrition. D. I. Givens, E., Owens, R. F. E., Axford and Omed H. M. ed CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Ørskov, O. and Reid, G. 1985. Use of by products and supplementary protein in dairy cow nutrition. *Vet. Rec.*116: 607-610
- Owens, F. N. and Bergen, W. G. 1983. Nitrogen metabolism of ruminal animals. Historical perspective, current understanding and the future implications. *Journal Animal Science*, 57: 498 – 518.
- Owens, F. N. and Zinn, R, 2005. Corn grain for cattle: Influence of processing on site and extent of digestion. *Proc. Southwest Nutr. Conf.:* 86-112.
- Owens, F. N. and Zinn, R. 1988. Metabolismo de las proteínas en rumiantes. Pp. 225 – 282. En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. Church, D. C. Ed. Acribial. Zaragoza España.
- Owens, F. N., Secrist D. S., Hill W.J. and D. R. Gill. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 75:868-879
- Payne, J. W. 1983. Peptide transport in bacteria: Methods, mutans and energy coupling. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 794 – 798.

- Peddie, J. Dejar, W. A., Gilbert, A. B. and Waddington, D. 1982. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). *Journal Agriculture Science*. 99: 233 – 263.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Fondevilla, M. and Guada, J. A. 1998. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. *Australian Journal of Agricultural Research*. 49: 907-914.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A. and Castrillo, C. 1997a. Contribution of dietary nitrogen and purine bases to the duodenal digesta: comparison of duodenal and polyester-bag measurements. *Animal Science*. 65: 237-245.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A. and Castrillo, C. 1997b. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of ¹⁵N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *Anim. Sci.*, 65, 225-236.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A., Castrillo, C. 1996a. Determination of rumen microbial-nitro-N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *British Journal of Nutrition*. 75: 699-709.
- Pérez, J. F., Rodríguez, C. A., González, J., Balcells, J. and Guada, J. A. 1996b. Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62: 251-262.
- Peyraud, J. L. 1996. Techniques for measuring herbage intake of grazing ruminants: A review. En: E Spörnley, E Burstedt and Murphy M. eds. *Managing high yield cows at pasture report N. 243*, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden.
- Pond, K. R., W. C. Ellis, J. H. Matis and A. G. Deswysen. 1989. Passage of chromium-mordanted and rare earth-labeled fiber: time of dosing kinetics. *J. Anim. Sci.* 67:1020 - 1028.
- Posada S L, Giraldo L A y Bolívar D M 2005b: Estimación de la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de derivados púricos. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. #63.

- Posada, S. L. y Rosero, R. 2005a. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 17 (4).
- Ranilla, M. J., Carro, M. D., López, S., Valdés, C., Newbold, J. C. and Wallace, R. J. 2000. ¹⁵N-ammonia incorporation by ruminal bacteria growing on different N sources. *Repr. Nutr. Develop.*, 40:2, 199.
- Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D. 2001. Comparación de diversos métodos de desligamiento de bacterias ruminales asociadas a la fase sólida de la digesta en un sistema *in vitro* (Rusitec). *ITEA (Vol. extra)*, 22, pp. 382-384.
- Reeves, M., Fulkerson, W. J. Kellaway, R. C. and Dove, H. A. 1996. Comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu *Pennisetum clandestinum* pasture. *Australian Journal Exp Agriculture*. 36: 23 – 30.
- Reeves, J. B., III. 1997. Relationships between crude protein and determination of nondispersible lignin. *Journal of Dairy Science*. 80: 692 - 699.
- Richardson, A. J.; Stewart, C. S.; Campbell, G. P.; Wilson, A. B. and Joblin, K. N. 1986. Influence of coculture with rumen bacteria on the lignocellulolytic activity of Phycomcetous fungi from the rumen. In *Microbial Ecology Section. XIV International Congress of Microbiology*, 7 -13 September (Manchester, England).
- Riveros, E., 1986. Digestibilidad de los forrajes como Expresión de su Valor Nutritivo.
- Robinson, P., Campbell, M. and Fadel, J. 1999. Influence of storage time and temperature on *in vitro* digestion on neutral detergent fiber at 48h, and comparison to 48h *in sacco* neutral detergent fiber digestion. *Animal Feed Science and Technology*. 80: 257-266.
- Rooney, L.W. and Pflugfelder, R.L. 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci*, 63: 1067-1623.
- Russell, J. B. 1991. Intracellular pH of acid tolerant ruminal bacteria. *Appl. Environment Microbiology*. 3383 – 3384.
- Russell, J. B. and Strobel, H. J. 1993. Microbial energetic. Pp. 165 – 176 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France. CAB. International, London and NY.

- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- Satter, L. and Roffler, R. 1981. Influence of Nitrogen and Carbohydrate Inputs on Rumen Fermentation. In: *Recent Developments in Ruminants Nutrition*. Ed. Haresign, W. y Cole, D. Butterworths. pp 115 - 139.
- Schelling, G. T. and Bryers, F. M. 1984. Cytosine as a marker for microbial nitrogen leaving the rumen. *Canadian Journal of Animal Science*. 64 (Suppl.): 62-71.
- Schofield P. and Pell A. N. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* 73:34553463.
- Schönhusen, U., Voigt, J., Kreienbring, F., Teuscher, F., 1995. Bewertung verschiedener Marker für die Messung der Mikrobiellen Stickstoffpassage am Duodenum der Milchkuh. *Arch. Anim. Nutr.*, 48, 147-158.
- Sibanda, S., Topps J. H., Storm, E. and Ørskov, E. R. 1982. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proc. Nutr. Soc.*, 41, 75A.
- Sibanda, S., Topps, J. H., Storm, E. and Ørskov, E. R., 1982. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proc. Nutr. Soc.*, 41, 75A.
- Siddons, R.C., Beever, D.E. and Nolan, J.V. 1982. A comparison of methods for the estimation of microbial nitrogen in duodenal digesta of sheep. *British Journal of Nutrition*. 48: 377-389.
- Smith, A. C. 1971. Determinación: de la ecuación de .predicción de la Digestibilidad in vivo a partir de la Digestibilidad in vitro: Estimaciones in vitro de los elementos nutritivos Digestibles totales (ENDT). Tesis. Opto. Zootecnia. Fac. Agr. Pont. U. Católica de Chile.
- Smith, R. H. and McAllan, A. B. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. *British Journal of Nutrition*. 24: 545 – 556.

- Smith, R. H., McAllan, A. B., Hewitt, P. and Lewis, P.E. 1978. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogen compounds entering the duodenum of cattle. *Journal Agricultural Science Cambridge*. 90: 557-568.
- Sniffen, C. J., Russell, J. B. and Van Soest, P. J. 1983. The influence of carbon source, nitrogen source and growth factors on rumen microbial growth factor in rumen microbial growth. *Proc. Cornell Nutr. Conf. Ithaca, NY*: 26 – 33.
- Soto – Navarro, S. A., Krehbiel, R. C., Duff, C. G., Galyean, L. M., Brown, S. M., and Steiner, S. L. 2000. Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit – feed steers. *Journal of Animal Science*. 78: 2215 – 2222.
- Stangassinger, M., Chen, X. B., Lindberg, J. E. and Giesecke, D. 1995. Metabolism of purines in relation to microbial production. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Engelhardt, W.w., Leonhard-Marek, S., Breves, G., Giesecke, D., eds. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Pp. 387-406.
- Stern M. D., Bach A. and Calsamiglia S. 1997. Alternative Techniques for Measuring Nutrient Digestion in Ruminants. *J. Anim. Sci.* 75: 2256–2276.
- Stern, M. D. and Hoover, W. H. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis. A review. *Journal of Animal Science*, 49, 1590 – 1603.
- Stern, M. D., Satter, L. D. 1982. Estimation of protein degradation using *in situ* and *in vitro* methods. In: Owens, F. N. editors. *Protein Requirements for cattle: Proc. International Symposium*. Stillwater. Okla. Division of Agriculture, Oklahoma State University. MP – 109: 72.
- Stern, M. D., Varga, G. A., Clark, J. H., Firkins, J. L. Huber, J. T. and Palmquist, D. L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 77: 2762 – 2786.
- Stevens, C. E. 1970. *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. Oriel Press, 1^a Edición. Pp. 101.
- Stock, R., N. R. Merchen, T. Klopfenstein, Y M. Poos. 1981. Feeding value of slowly degraded proteins. *J. Anim. Sci.* 53:1109.
- Sullivan, J. T. 1955. Cellulose and lignin in forage grasses and their digestion coefficients. *Journal of Animal Science*. 14: 710 - 717.

- Sunvold, G. D. and Cochran, R. C. 1991. Technical note: evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. *Journal of Animal Science*. 69: 4951 – 4955.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science*. 49: 1615 – 1630.
- Tamminga, S. and Chen X. B. 2000. Animal- based techniques for the estimation of protein value of forages. Pp. 215 – 231 in *Forage Evaluation in ruminant nutrition*. Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E. and Omed, H. M. CAB International. Wallingford, UK.
- Teather R. M. and Sauer F. D. 1988. A Naturally Compartmented Rumen Simulation System for the Continuous Culture of Rumen Bacteria and Protozoa *J. Dairy Sci.* 71: 666-673.
- Tebot I, Britos A, Godeau J M and Cirio A 2002 Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea sparing in normal and low protein fed Corriedale sheep. *Veterinary Research* 33: 101
- Theodorou, M. K., and France, J. 1993. Rumen microorganism and their interactions. Pp. 146 – 163 in *Quantitative aspects of ruminant Digestion and Metabolism*. J.M. Forbes and J. France. CAB International, London and NY.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mc Allan, A. B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48, 185-197.
- Theodorou, M. K.; Lowe, S. E. and Trinci, A. P. J. 1988. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *Biosystem* 21: 371-376.
- Theurer C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 63:1649-1662

- Thomas, S. and Campling. 1976. Relationships between digestibility and faecal nitrogen in sheep and cows offered herbage *ad libitum*. *Journal of the Grassland Society*. 31: 69 – 72.
- Thomson, D. J. and Beever, D. E. 1980 the effect of conservation and processing on the digestion of forages in ruminants. En: *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Ed. Ruckebush. Y. MTP Press. Pp. 291 -308.
- Tilley, J. and Terry, R. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of foragecrops. *J. Br. Grass Soc.* 18: 104-111.
- Titgemeyer, E. C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*. 75: 2235 – 2247.
- Titgemeyer, E. C., Merchen, N. R., Berger, L. L. 1989. Evaluation of soybean meal, corn gluten meal, blood meal and fish meal as sources of nitrogen and amino acids disappearing from the small intestine of steers. *Journal of Animal Science*. 67: 262-275.
- Topps, J. H. and Elliott, R. C. 1965. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature (Lond.)*. 205: 498-499.
- Tweedie, J. W., Rurnsby, M. G. and Hawke, J. C. 1966. Studies in rumen metabolism.V. Formation of branched long-chain fatty acids in cultures of rumen bacteria. *Journal of Science Food and Agriculture*. 17: 241-244.
- Ushida, K., Lassalas, B. and Jouany, J. P. 1985. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. *Reproduction and Nutrition Development*., 25, 1037-1046.
- Vagnoni, D. B., Broderick, G. A., Clayton, M. K. and Hatfield, R. D. 1997 Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science* 80: 1695-1702.

- Van Hourter, M. F. J. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants feed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 43: 189 – 225.
- Van Keulen, J. and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44:282 - 287.
- Van Nevel, C. J. and Demeyer, D. I. 1977. Determination of rumen microbial growth *in vitro* from ³²P-labelled phosphate incorporation. *British Journal of Nutrition*. 38: 101-114.
- Van Soest P. J., Wine R. H. and Moore L. A. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. *Proc. 10th Int. Grasslands Congr., Helsinki*. pp. 438-441.
- Van Soest. P. J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant animal*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Van Soest. P. J. 1994. *Nutritional ecology of ruminant*. O&B Books Inc. Oregon, USA 2^a ed. Pp. 77-93.
- Varel, V., Kreikermeier, K. 1995. Technical note: comparison of *in vitro* and *in situ* digestibility methods. *Journal of Animal Science*. 73: 578-582
- Varga, G. A. and Kolver, E. S. 1997 microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*. 127: 819 – 823.
- Veira, D. 1986. The role of ciliate protozoa on nutrition of the ruminant. *Journal of Animal Science*. 63: 1547 – 1560.
- Verbic, J., Chen, X. B., Macleod, N. A. and Ørskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 114: 243-248.
- Villalobos, G. C., González, V. S. E. y Alonso, O. J. 2000. Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. *Técnica Pecuaria*. 38: 119 – 134.
- Vogel, K., Pedersen, J., Materson, S. and Toy, J. 1999. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF and IVDMD forage analysis. *Crop Science*. 39: 276-279.

- Wallace, J. D. and Van Dyne, G. M. 1970. Precision of indirect methods for estimating digestibility of forage consumed by grazing cattle. *Journal Range Manage.* 26:424 - 430.
- Wallace, R. J. 1983. Hydrolysis of 14 C- labeled proteins by rumen microorganism and by proteolytic enzymes prepared from rumen bacteria. *British Journal of Nutrition.* 50: 345 – 355.
- Wallace, R. J. 1991. Rumen proteolysis and its control. Pp. 131 – 150. En: *Rumen microbial metabolism and ruminal digestion.* Jouany, P. J. Ed. INRA editions , Paris.
- Wallace, R. J., Cotta, M. A. 1998. Metabolism of nitrogen-containing compounds. En: “the rumen microbiology ecosystem” Ed: P.N. Hobson. Elsevier Science publisher. Pp 217-245.
- Wallace, R. J., McPherson, A. C. 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in the rumen fluid. *British Journal of Nutrition.* 58: 313 – 323.
- Warner, A. C. 1981. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. *Nutri. Abs. Rev.* 51: 789 – 820.
- Warren,, W. P., Martz, A. F., Asay, K. M., Hilderbrand, E. S., Payne, C. G., Vogt, J. R. 1974. Digestibility and rate of passage by steers fed tall frescua, alfalfa and orchardgrass hay in 18 and 32° C ambient temperature. *Journal Animal Science.* 39: 93 – 96.
- Wegner, G. H. and Foster, E. M. 1963. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes* *Journal Bacteriology.*85: 53-61.
- Weimer, P. J., Waghorn, G. C., Odt, C. L. and Mertens, D. R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science.* 82: 122 – 134.
- Weir, W. C., Meyer, J. H. and Lofgreen, G. P. 1959. Symposium on forage evaluation: VI. The use of the esophageal fistula, lignin, and chromogen techniques for stuying selective grazing and digestibility of range and pasture by sheep and cattle. *Agronomy Journal.* 51: 235 - 237.
- Weller, A. F. and Pilgrim, A. R. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *British Journal of Nutrition.* 32: 341 – 351.
- Weston, R. H. and Hogan, J. P. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of rye grass and forage oats. *Aust. Journal Agricultural Research.* 19:419-432.
- Whindham, W. R. and Akin, D. E. 1984. Rumen fungi and forage fiber degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:473-476.
- Whithouse, N. L., Olson, V. M., Schwab, C. G., Chesbro, W. R., Cunningham, K. D. and Lykos, T. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganims from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.,* 72, 1335-1343.

- Williams, A. G. and Coleman, G. S. 1986. The rumen protozoa. En: the rumen microbial ecosystem. Ed. Hobson, P. N. Elsevier applied Science. London and NY.
- Williams, A. G. and Orpin, C. G. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Can. J. Microbio.* 33: 427-434.
- Wilman, D. and Adesogan A. 2000. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the *in vitro* digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology.* 84: 33-47.
- Wood, T. M.; Wilson, C. A.; McCrae, S. and Joslin, K. N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbio. Letters* 34: 37-40.
- Yokoyama M T y Johnson K A. 1998. Microbiología del rumen e intestino. En: El rumiante fisiología digestiva y nutrición. Ed. Church, C.D. editorial Acribial. Zaragoza, España.
- Zeoula, L. M., Do Prado, P. I., Moura, D. H., Valério, L. J., De Caldas S. F., Midore, E., Pra, P. P., Marques, J. A. and Da Silva F. A. J., 2002. Recuperação Fecal de Indicadores Internos Avaliados em Ruminantes. *Rev. Bras. zootec.* 31(4):1865-1867.
- Zinn, R. A. and Owens, F. N. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 157-166.
- Zinn, R. A., Bull, L. S. and Hemken, R. W. 1982. Degradation of supplemental proteins in the rumen. *Journal of Animal Science.* 52: 857.

III. Planteamiento del problema

1. El interés por la utilización de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes se ha venido incrementando en el ámbito mundial en los últimos años, a medida que la disponibilidad de granos se reduce (Fuentes et al., 2001). Existe una gran cantidad de residuos agrícolas y subproductos agroindustriales (paja, rastrojo, tallos, etc.) que pueden ser empleados como fuente alternativa de energía y proteína en la alimentación de rumiantes. Un ejemplo de estos subproductos es el heno de chícharo (*Pisum sativum*), que es abandonado en la parcela después de la cosecha de las vainas del chícharo sin un uso racional como sería para la alimentación animal (Bastida et al., 2011). Algunas investigaciones se han enfocado a dietas de crecimiento y finalización con heno de chícharo. Algunos autores indican un consumo de materia seca (CMS), una eficiencia en la conversión alimenticia y ganancia diaria de peso similar cuando el heno de chícharo reemplaza los cereales en dietas de crecimiento y finalización en bovinos (Reed et al., 2004), pero existen pocos estudios en ovinos (Bastida et al., 2011). Se ha mencionado que las características nutritivas de estos recursos forrajeros deprimen el consumo de alimento, la digestibilidad, el índice de fermentación y el suministro de nitrógeno microbiano (Mekasha et al., 2003) y debido a que el nitrógeno es un nutriente limitante en los forrajes de baja calidad, la suplementación con fuentes de nitrógeno proteico o nitrógeno no proteico (NNP) han sido utilizados para el aporte de amoníaco a nivel ruminal para cubrir los requerimientos de proteína microbiana (Fondevila y Barrios, 2001; Manyuchi et al., 1997).
2. Los granos de cereales son procesados antes de la alimentación del ganado, debido a que un pericarpio intacto impide la adhesión de las bacterias para su digestión, por lo cual, se han adoptado varios métodos para mejorar la utilización de los cereales para la industria ganadera, incluyendo la reducción en el tamaño de partícula, la cual se puede realizarse mediante el molido o rolado seco (DePeters et al. 2003; Al-Rabadi et al. 2011). Las características físicas y químicas de los gránulos de almidón de los cereales son muy complejos. El maíz a diferencia de la cebada, contiene una región de endospermo harinoso y uno vítreo. Los gránulos en el

endospermo harinoso son más susceptibles al procesamiento del grano y a la digestión enzimática ya que están envueltos por una capa delgada de matriz proteica en contraste con la capa que envuelve al endospermo corneo o vítreo (DePeters et al. 2007). El grano de sorgo es una fuente importante de energía en la dieta, ya que al igual que otros cereales es rico en almidón, el cual es comparable con el maíz (Ezeogu et al. 2005). Sin embargo, la mayor limitante es su baja digestibilidad debido a la densa capa de matriz proteica en el endospermo periférico del núcleo, que impide la digestión de los gránulos de almidón en el rumen (Abdelhadi et al. 2006). En los últimos años, los cereales han sido utilizados en la industria ganadera, y para poder ser aprovechados por los rumiantes, han sido sometidos a varios métodos de procesamiento como son: hojueado al vapor, reconstitución, cosechado temprano con alta humedad (ensilado), reventado, micronizado, mientras que el no procesado se refiere al grano entero, quebrado, molido y rolado seco (Theurer, 1986; Guada, 1993). Estudios relacionados con los efectos del procesamiento en la alteración del almidón y la proteína de los cereales y su utilización se pueden clasificar en tres categorías: 1) rendimiento y eficiencia en el aprovechamiento del alimento; 2) las mediciones *in vitro* en los cambios estructurales del almidón, los índices de fermentación microbiana ruminal o degradación enzimática y 3) en las determinaciones ruminal, posruminal y total *in vivo* (DePeters et al., 2003). Debido a que, en los estudios *in vivo* los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales, actualmente existen numerosos análisis de laboratorio para estimar la digestión ruminal e intestinal de la proteína (Calsamiglia et al. 1995; Gargallo et al. 2006) utilizando varios procedimientos enzimáticos los cuales son simples y de costo razonable comparado con los métodos *in vivo* (Danesh Mesgaran et al. 2005). La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou et al., 1994). Una ventaja de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell et al., 1997). El método *in sacco*, tiene como objetivo fundamental proporcionar estimativas de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes de los

alimentos sometidos al efecto del ambiente ruminal (Olivera, 2001). El sistema Daisy^{II} (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU) se utiliza como método alternativo para calcular la degradación *in vitro* del alimento en el rumen e intestino en condiciones de laboratorio. Por otra parte; la tasa de digestión de los nutrientes de un alimento varía inversamente con el tamaño de partícula, este efecto es más evidente en granos de baja degradabilidad ruminal como el sorgo y el maíz, ya que en función del tipo de procesamiento y de la dieta acompañante, puede modificarse el sitio de digestión de los granos (Ramos et al. 2009; Al-Rabadi et al. 2011).

IV. Objetivos

1. Evaluar el comportamiento productivo en corderos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de inclusión de HC y estimar la fermentación ruminal a partir de la producción de gas *in vitro*.
2. Estimar la composición química, la producción de gas *in vitro* y la degradación de la proteína a nivel ruminal e intestinal, utilizando granos de sorgo o maíz.
3. Evaluar la digestibilidad de los diferentes granos de sorgo procesados por medio de los métodos *in vivo*, *in sacco*, *in vitro* (producción de gas y Daisy), en bovinos alimentados con sorgo reconstituido con un 35% de humedad, sorgo quebrado y ensilado a 21 días y del sorgo entero ensilado a 42 días, así como la producción de gas a las 24 horas.
4. Evaluar la producción de síntesis de proteína microbiana a partir de métodos indirectos, en bovinos alimentados con sorgo reconstituido con un 35% de humedad, sorgo quebrado y ensilado a 21 días y del sorgo entero ensilado a 42 días, así como la producción de gas a las 24 horas.

V. Material y métodos

1.1. Experimento 1. INCLUSION DE HENO DE CHICHARO (*Pisum sativum* L.) Y PRODUCCION DE GAS IN VITRO EN DIETAS PARA CORDEROS EN CRECIMIENTO

El estudio se realizó en la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, se utilizaron veinte ovinos de la raza Rambouillet, con un promedio de 5 meses de edad y 26.0 ± 0.43 kg PVi, los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos. Considerando un tratamiento como testigo y tres niveles de inclusión de HC (0%; 25%; 50% y 75%), las dietas fueron formuladas iso-proteica e iso-energéticamente (13.26% PC y 8.8 MJ EM kg⁻¹ MS) basado en forraje (heno de chícharo: HC; rastrojo de maíz: RM) y concentrado (maíz grano: MG; pasta de soya: SBM; harina de pescado: HP) complementado con vitaminas y minerales (Multitec de Malta[®]), la composición química de los ingredientes, se presenta en el Cuadro 2; las dietas fueron formuladas de acuerdo a las recomendaciones propuestas por el AFRC (1996), cubriendo las necesidades de los animales para su nivel de crecimiento. Las variables a medidas fueron: consumo de materias seca, ganancia diaria de peso, conversión y eficiencia alimenticia.

El HC utilizado para este estudio fue obtenido directamente del campo, después de la última cosecha (3^{er} cosecha) de la semilla de chícharo. El HC fue molido utilizando un molino de martillos (Azteca mill, 5 mm Ø), y así evitar su desperdicio. El concentrado y las proporciones de forraje fueron mezclados homogéneamente para evitar la selección de los ingredientes, para ello se utilizó una mezcladora vertical de tolva al piso (Azteca)

1.2. Experimento 2. Comparación de técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in sacco* en la determinación ruminal e intestinal del grano de maíz (*Zea maíz*) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench).

Procesamiento de maíz y sorgo

Se obtuvieron muestras de maíz y sorgo de un lote comercial, el cual contenía los granos enteros y cantidades insignificantes de granos partidos. Para un correcto procesamiento los granos enteros fueron quebrados (Molino azteca[®], 1 mm Ø) para asegurar

un tamaño de partícula homogéneo en ambas muestras. Posteriormente se tomaron 1000 g de cada muestra para análisis posteriores.

Tamaño de partícula

Para la determinación de tamaño de partícula, se utilizaron 100 g de cada cereal por duplicado en un agitador W.S TYLER 8570 (Mod. RX-812) con cribas del número 6 (3.360 mm), 7 (2.830 mm), 10 (2.000 mm), 20 (0.840 mm), 30 (0.590 mm), 40 (0.420 mm), con un tiempo de agitación de 10 minutos por cada tratamiento (Ensor, 1970) por triplicado.

Evaluación *in vivo*

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) canulados en rumen y duodeno, los cuales fueron alimentados con uno de dos tratamientos maíz y sorgo. Los animales fueron alimentados a las 0800 y 2000 h al 2 % PV, con acceso libre al agua. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d para adaptación a las dietas y 5 d para la recolección de muestras. Las dietas se utilizaron (Cuadro 1) con un 73% de inclusión en MS de cada uno de los tratamientos y el resto (% MS) fue a base de melaza de caña (5%), urea (1%), sales minerales (0.05%), heno de avena (12%) y heno de alfalfa (6%), para cubrir sus necesidades de mantenimiento (NRC, 1996). Se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) al 0.40% de inclusión en el suplemento como marcador de flujo (Corona et al., 2005). Se tomaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 ml/ hora de muestreo), por cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350 h, el día 17 a las 0900 y 1500 h, el día 18 a las 1050 y 1650 h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Evaluación *in situ*

Se utilizaron dos bovinos de raza holstein (PV 300 ± 50 Kg) con cánula ruminal permanente para determinar la digestibilidad de la MS y la proteína (PC) de acuerdo a la técnica descrita por Ørskov y McDonald (1979). Los animales fueron alimentados *ad libitum* (0800 y 1600 h), con una dieta que contenía 60% heno de avena y 40% concentrado

a base de sorgo y soya (15% PC, 12.56 MJ EM/ kg MS). Se pesaron 5 g MS de muestra y fueron colocados en bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μ m), para posteriormente ser sometidas a 24h de incubación ruminal por triplicado, posteriormente las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad ruminal *in vitro*

Las muestras de grano fueron incubadas *in vitro*, para la cual se preparó un medio de cultivo de acuerdo a la metodología descrita por Daisy^{II} (Ankom Technology – 11/00), que consta de dos soluciones buffer: solución A: KH_2PO_4 (10 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/l), NaCl (0.5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), Urea (grado reactivo; 0.5g/l); solución B: NaCO_3 (15 g/l) y $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1g/l). El medio de cultivo se realizó en una proporción de 4:1 (medio de cultivo: líquido ruminal) a una temperatura de 39° C, agitando la solución para permitir una mezcla uniforme. El líquido ruminal se obtuvo de los dos bovinos fistulados mencionados anteriormente. Se utilizaron 24 bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μ m) depositando en cada una de ellas 5 g MS de muestra. Los granos fueron incubados por 24 h, depositando tres bolsas por jarra, realizándose dos repeticiones. Pasado el tiempo las bolsas fueron lavadas con agua hasta que el agua escurrió limpia, para después ser secadas en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad intestinal *in vitro*

Los residuos obtenidos de la digestión *in vitro* (Daisy^{II}) e *in situ* fueron sometidos a una digestión intestinal (pepsina-pancreatina), de acuerdo al método descrito por Gargallo et al. (2006). En cada una de las jarras de digestión se incubaron al azar ocho replicas (bolsas Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μ m) por tratamiento (4 bolsas/jarra con 2 g MS de muestra), incluyendo un blanco, con el fin de generar el factor de corrección; se introdujeron dentro de cada jarra que contenía una solución de 2 L de HCl al 0.1 N ajustada a un pH de 1.9 con 1 g/L de pepsina (P-700), permaneciendo por un tiempo de 1 h a una rotación constante a 39 °C. Pasado ese tiempo, las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia, posteriormente fueron

depositadas dentro de las jarras de incubación (4 bolsas/jarra) los cuales contenían 2 L de una solución de pancreatina (con una solución buffer de KH_2PO_4 al 0.5M ajustada a un pH de 7.75) conteniendo 50 ppm de timol y 3 g/L de pancreatina (P-7545, Sigma), y permanecieron a una rotación circular constante a 39 °C durante 24 h. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Producción de gas *in vitro*

Para determinar la cinética de degradación ruminal se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo al método descrito por Theodorou et al. (1994) y Mauricio et al. (1999). Aproximadamente 0.800 g MS de cada ingrediente fueron incubados en botellas de vidrio con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal teniendo una réplica de tres botellas por muestra. El líquido ruminal fue colectado de dos bovinos de raza Holstein (500 ± 10 kg PV). De cada bovino se colectó una cantidad aproximada de 0.5 L de líquido ruminal y 100 g de sólido previo a la alimentación (0730 h) de los animales y filtrado en triple capa de gasa y lana de vidrio, se homogenizó con CO_2 durante cinco minutos, posteriormente fueron mezclados y utilizados como inóculo. Las botellas fueron incubadas en un baño de agua a 39°C. El volumen de gas fue registrado a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 h de incubación (Streeter et al., 1993) por medio de un transductor de presión marca Delta (Modelo HD 8804). Una vez finalizado el periodo de incubación, se tomó una muestra de contenido de los frascos para posteriores análisis y las muestras fueron filtradas y secadas (48 h, 65 °C) para determinar la proporción de materia seca desaparecida (MSd). La producción de gas a las 24 h se correlacionó con la materia seca desaparecida para obtener la producción de gas relativa (PGR, ml gas g⁻¹ MSd) (Gonzalez Ronquillo et al., 1998).

1.3. Experimento 3. Características nutritivas del grano de sorgo (entero o quebrado) utilizando la técnica de producción de gas *in vitro*.

Grano de sorgo y tratamientos.

Se obtuvieron muestras de sorgo de un lote comercial, el cual contenía los granos enteros y cantidades insignificantes de granos partidos. Para el desarrollo del presente estudio se utilizó sorgo entero seco (SES), sorgo entero ensilado (SEE), sorgo quebrado

seco (SQS) y sorgo quebrado ensilado (SQE). La reconstitución del grano se realizó mediante la adición de agua a todo el grano, para elevar la humedad a un 35%, para ello se utilizaron dos muestras, la primera se ensilo a 42 días utilizando grano entero (SEE) y 21 días utilizando sorgo quebrado (SQE) (Huck et al., 1999; Simpson et al., 1985). Pasado el tiempo de ensilado se tomaron 1000 g de alimento directamente de los silos por triplicado, y se congelaron a -20° C para análisis posteriores.

Producción de gas *in vitro*

Para determinar la cinética de degradación ruminal se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo al método descrito por Theodorou et al. (1994) y Mauricio et al. (1999). Aproximadamente 0.800 g MS de cada ingrediente fueron incubados en botellas de vidrio con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal teniendo una réplica de tres botellas por muestra. El líquido ruminal fue colectado de dos bovinos de raza Holstein (500 ± 10 kg PV). De cada bovino se colectó una cantidad aproximada de 0.5 L de líquido ruminal y 100 g de sólido previo a la alimentación (0730 h) de los animales y filtrado en triple capa de gasa y lana de vidrio, se homogenizó con CO₂ durante cinco minutos, posteriormente fueron mezclados y utilizados como inóculo. Las botellas fueron incubadas en un baño de agua a 39°C. El volumen de gas fue registrado a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas de incubación (Streeter et al., 1993) por medio de un transductor de presión marca Delta (Modelo HD 8804). Una vez finalizado el periodo de incubación, se tomó una muestra de contenido de los frascos para posteriores análisis y las muestras fueron filtradas y secadas (48 h, 65°C) para determinar la proporción de materia seca desaparecida (MSd). La producción de gas a las 24 h se correlacionó con la materia seca desaparecida para obtener la producción de gas relativa (PGR: ml gas g⁻¹ MSd) (Gonzalez Ronquillo et al., 1998).

1.4. Comparación de técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in sacco* en la determinación de la digestibilidad ruminal e intestinal del grano de sorgo reconstituido y ensilado

Grano de sorgo y tratamientos

Las muestras de sorgo fueron obtenidas de un lote comercial, el cual contenía los granos enteros y cantidades insignificantes de granos partidos. Para el desarrollo del

presente estudio se utilizó sorgo entero seco (**SES**), sorgo entero ensilado (**SEE**), sorgo quebrado seco (**SQS**), sorgo quebrado ensilado (**SQE**), las cuales fueron molidas en un molino Willey a 3 mm Ø (Arthur H. Thomas Philadelphia, PA) para las incubaciones *in vitro* e *in situ* y de 1 mm para la producción de gas. La reconstitución del grano se realizó mediante la adición de agua a todo el grano, para elevar la humedad a 35%, para ello se utilizaron dos muestras, la primera se ensiló a 42 días utilizando grano entero (**SEE**) y 21 días utilizando sorgo quebrado (**SQE**) (**Huck, 1999; Simpson, 1985**). Ambas muestras fueron ensiladas en botes de polietileno con una capacidad de 200L y almacenadas a temperatura ambiente (25 a 27° C) en un cuarto oscuro, para después ser abiertos en el tiempo antes mencionado. Pasado el tiempo de ensilado se extrajo una cantidad de 1000 g de muestra de la parte del centro de cada macrosilo, colocándolo en bolsas de polietileno, y se almacenaron a -20° C para análisis posteriores.

Tamaño de partícula

Para la determinación de tamaño de partícula, se utilizó un agitador W.S TYLER 8570 (Mod. RX-812) con cribas del número 6 (3.360 mm), 7 (2.830 mm), 10 (2.000 mm), 20 (0.840 mm), 30 (0.590 mm), 40 (0.420 mm), con un tiempo de agitación de 10 minutos por cada tratamiento (**Ensor, 1970**).

Evaluación *in vivo*

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) canulados en rumen, los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos, SES, SEE, SQS y SQE. Los animales fueron alimentados a las 0800 y 2000 h al 2 % PV, con acceso libre al agua de bebida. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d para adaptación a las dietas y 5 d para la recolección de muestras. Las dietas se utilizaron (Cuadro 1) con un 73% de inclusión en MS de cada uno de los tratamientos y el resto (% MS) fue a base de melaza de caña (5%), urea (1%), sales minerales (0.05%), heno de avena (12%) y alfalfa (6%), para cubrir sus necesidades de mantenimiento (**NRC, 1996**). Se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) al 0.40% de inclusión en el suplemento como marcador de flujo (**Corona et al., 2005**). Se tomaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 ml/ hora de muestreo), por cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350h, el día 17 a las 0900 y 1500h, el día

18 a las 1050 y 1650h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Evaluación *in situ*

Se utilizaron tres bovinos de raza holstein (PV 300 ± 50 Kg) con cánula ruminal permanente para determinar la digestibilidad de la MS y la proteína (PC) de acuerdo a la técnica descrita por **Ørskov y McDonald (1979)**. Los animales fueron alimentados *ad libitum* (0800 y 1600 h), con una dieta que contenía 60% heno de cebada y 40% concentrado a base de sorgo y soya (15% PC, 12.56 MJ EM/ kg MS). Se pesaron 5 g MS de muestra y fueron colocados en bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μ m), para posteriormente ser sometidas a 24h de incubación ruminal por triplicado, posteriormente fueron lavados manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60° C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad ruminal *in vitro*

Las muestras de grano fueron incubadas *in vitro*, para la cual se preparó un medio de cultivo de acuerdo a la metodología descrita por Daisy^{II} (**Ankom Technology – 11/00**), que consta de dos soluciones buffer: solución A: KH_2PO_4 (10 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/l), NaCl (0.5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), Urea (grado reactivo; 0.5g/l); solución B: NaCO_3 (15 g/l) y $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1g/l). El medio de cultivo se realizó en una proporción de 4:1 (medio de cultivo: líquido ruminal) a una temperatura de 39° C, agitando la solución para permitir una mezcla uniforme. El líquido ruminal se obtuvo de los bovinos fistulados mencionados anteriormente. Se utilizaron 45 bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μ m) depositando en cada una de ellas 5 g MS de muestra. Los granos fueron incubados por 24 h, depositando 5 bolsas por jarra, realizándose tres repeticiones. Pasado el tiempo las bolsas fueron lavadas con agua de la llave hasta que el agua escurrió limpia, para después ser secadas en estufa de aire forzado a 60° C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad intestinal *in vitro*

Los residuos obtenidos de la digestión *in vitro* (Daisy^{II}) e *in situ* fueron sometidos a una digestión intestinal (pepsina-pancreatina), de acuerdo al método descrito por **Gargallo et al. (2006)**. En cada una de las jarras de digestión se incubaron al azar ocho replicas (bolsas Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μm) por tratamiento (10 bolsas/jarra con 1 g MS de muestra), incluyendo un blanco, con el fin de generar el factor de corrección, se introdujeron dentro de cada jarra que contenía una solución de 2 L de HCl al 0.1 N ajustada a un pH de 1.9 con 1 g/L de pepsina (P-700), permaneciendo por un tiempo de 1 h a una rotación constante a 39° C. Pasado ese tiempo, las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia, posteriormente fueron depositadas dentro de los botes de incubación (10 bolsas por bote) los cuales contenían 2 L de una solución de pancreatina (con una solución buffer de KH_2PO_4 al 0.5M ajustada a un pH de 7.75) conteniendo 50 ppm de timol y 3 g/L de pancreatina (P-7545, Sigma), y permanecieron a una rotación circular constante a 39°C durante 24 h. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60° C por 72 horas para análisis posteriores.

Producción de gas *in vitro*

Para determinar la cinética de degradación ruminal se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo al método descrito por **Theodorou et al. (1994)** y **Mauricio et al. (1999)**. Aproximadamente 0.800 g MS de cada ingrediente fueron incubados en botellas de vidrio con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal teniendo una réplica de tres botellas por muestra. Se tomaron muestras de líquido ruminal (0.5 L) y sólido (100 g en fresco) de los bovinos mencionados anteriormente, previo a la alimentación (0730 h) de los animales, extraído y filtrado en triple capa de gasa y lana de vidrio, se homogenizó con CO_2 durante cinco minutos, posteriormente fueron mezclados y utilizados como inóculo. Las botellas fueron incubadas en un baño de agua a 39°C. El volumen de gas fue registrado a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas de incubación por medio de un transductor de presión marca Delta (Modelo HD 8804). Después del periodo de incubación, se tomó una muestra de contenido de los frascos para posteriores análisis y las muestras fueron filtradas y secadas

(48 h, 65 °C) para medir la proporción de materia seca desaparecida (MSd). La producción de gas a las 24 h se correlacionó con la materia seca desaparecida para obtener la producción de gas relativa (PGR: ml gas g⁻¹ MSd) (**Gonzalez Ronquillo et al., 1998**).

1.5. Efecto del grano de sorgo, procesamiento, eficiencia alimenticia y síntesis de proteína microbiana en terneros

Animales y dietas

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) provistos de una canula ruminal y duodenal (cánula tipo T), los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos, distribuidos en un cuadro latino 4 X 4, Sorgo entero seco (SES), Sorgo entero ensilado (SEE), Sorgo quebrado seco (SQS) y Sorgo quebrado ensilado (SQE). Los animales fueron alojados en corraletas individuales (2.80 x 2 m) y tuvieron agua al libre acceso. El consumo de materia seca (CMS) fue restringido al 2% de su PV y se ofreció en igual proporción a las 0800 y 2000 h. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d fueron para adaptación a las dietas y los últimos 5 d para la recolección de muestras. La composición de las dietas experimentales se muestra en el **Cuadro 1**. Se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) al 0.40% de inclusión en el complemento como marcador de flujo (Corona et al., 2005)

La reconstitución del grano se realizó mediante la adición de agua a todo el grano, para elevar la humedad a 35%, para ello se utilizaron dos muestras, la primera se ensiló a 42 días utilizando grano entero (SEE) y otra se quebró a 1 mm (Molino azteca, 1 mm Ø) y fue ensilado por 21 días (SQE) (SQE) (Huck, 1999; Simpson, 1985). Ambas muestras fueron ensiladas en botes de polietileno con una capacidad de 200L y almacenadas a temperatura ambiente (25 a 27° C) en un cuarto oscuro, para después ser abiertos en el tiempo antes mencionado. Pasado el tiempo de ensilado se extrajo una cantidad de 1000 g de muestra de la parte del centro de cada macrosilo, colocándolo en bolsas de polietileno, y se almacenaron a -20° C para análisis posteriores.

Toma de muestras

Se utilizaron 200 g de alimento directamente de los silos durante los periodos de muestreo a las 1200 h y fueron congeladas a -20° C para análisis posteriores. Se colectaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 mL/ hora de muestreo), durante cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350h, el día 17 a las 0900 y 1500h, el día 18 a las 1050 y 1650h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Se colecto un spot de 100 ml de orina en contenedores de plástico el día 19 y se les agrego 10 ml de ácido sulfúrico para después ser congeladas a - 20°C para análisis posteriores. El día 20 se colectaron muestras de liquido ruminal (200 mL) a las 1200 h, para la determinación de pH (Orión 261S, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.), posteriormente se utilizaron 40 ml de liquido ruminal a los cuales le fueron adicionados 10 mL de ácido metafosfórico, previamente filtrado a través de cuatro capas de gasa, y congeladas a -20° C para posteriores análisis (Corona, 2005).

VI. Resultados y discusión

Los resultados y discusión se muestran en los artículos científicos que a continuación se presentan, el primero ha sido aceptado por la revista **Tropical and subtropical Agroecosystems** y los otros dos enviados la revista **Tropical and subtropical Agroecosystems** y **Spanish Journal of agricultural research**, respectivamente.



INCLUSION DE HENO DE CHICHARO (*Pisum sativum* L.) Y PRODUCCION DE GAS IN VITRO EN DIETAS PARA CORDEROS EN CRECIMIENTO

[INCLUSION OF FIELD PEA HAY (*Pisum sativum* L.) AND IN VITRO GAS PRODUCTION IN DIETS FOR GROWING LAMBS]

Ulises Alejandro González García¹, Manuel González Ronquillo^{1*}, Julieta G. Estrada Flores², Jorge Luis Bastida García¹, Nazario Pecador Salas¹, Abdel-Fattah Z.M. Salem¹

¹Departamento de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. ²Instituto de Investigación en Ciencias Agropecuarias y Rurales. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México. Instituto Literario No 100, Col Centro. CP 50000

E-mail: mrg@uaemex.mx

*Corresponding Author

RESUMEN

La utilización de subproductos agroindustriales como el heno de chícharo (*Pisum sativum*) es una alternativa para la alimentación de ovinos, el objetivo del presente estudio fue evaluar la ingestión y digestibilidad en ovinos alimentados con diferentes niveles de inclusión de heno de chícharo (HC). Para ello se utilizaron 20 ovinos con un PV inicial de 26.0 ± 0.43 kg, los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos (0%; 25%; 50% y 75% de inclusión de HC en base seca). El contenido de PC del HC fue de 8%. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.1$) entre tratamientos para la ingestión de MS (947.57 ± 32.25 g/d¹), MO (856.74 ± 24.76) y FND (583.46 ± 30.6), así como para la digestibilidad (g/100g) de la MS (50.32 ± 1.0), MO (49.4 ± 2.38) y FND (57.04 ± 2.23). El consumo de N fue menor ($P < 0.05$) para el tratamiento con 25 % HC con respecto a 0%, no se observaron diferencias ($P > 0.1$) para la excreción de N en heces, orina y el balance de N entre tratamientos. En la producción de gas *in vitro* la fracción A (ml gas/g MS incubado) fue menor para HC con respecto a rastrojo de maíz (RM) y maíz grano (MG). La fracción b fue mayor ($P < 0.05$) para HC respecto a los demás ingredientes, sin embargo no se encontraron diferencias ($P > 0.1$) entre RM y MG para la fracción c. La producción de gas relativa (ml gas/ g MS desaparecida) fue menor para HC con respecto a RM y MG, La MS desaparecida *in vitro* fue menor para HC con respecto a MG, sin embargo no se encontraron diferencias ($P > 0.1$) entre RM y HC. El heno de chícharo puede ser utilizado en dietas para ovinos hasta en un 75 % de inclusión, sin afectar la ingestión y digestibilidad. La técnica de producción de gas *in vitro* permite predecir la fermentación y degradación ruminal, mostrando una menor fermentación con un 25 % de inclusión de heno de chícharo.

Palabras claves: Corderos; Comportamiento productivo; Heno de chícharo; Producción de gas *in vitro*.

SUMMARY

The use of byproducts such as field pea (*Pisum sativum*) is an alternative to feed sheep, the objective of this study was to evaluate the intake and digestibility in sheep fed different levels of field pea hay (FPH). Twenty Rambouillet lambs (with an initial BW of 26.0 ± 0.43 kg) were fed to one of four treatments of 5 animals of each (0%, 25%, 50% and 75% inclusion of PH as dry matter basis). The content of CP for the FPH was 8%. There were no significant differences ($P > 0.1$) between treatments for DM intake (947.6 ± 32.3 g/d), OM (856.7 ± 24.8) and NDF (583.5 ± 30.6), as well as digestibility (g/100g) of DM (50.3 ± 1.0), OM (49.4 ± 2.38) and NDF (57.0 ± 2.23). N intake was lower ($P < 0.05$) for PH 25% compared to 0%, no significant differences ($P > 0.1$) for N excretion in feces, urine and N balance between treatments. *In vitro* gas production in the fraction A (ml gas / g DM incubated) was lower in FPH compared to corn stover (CS) and corn grain (CG). Fraction b was higher ($P < 0.05$) for FPH compared to the other ingredients, however there were no differences ($P > 0.1$) between CS and CG for fraction c. Gas production (ml gas / g DM disappeared) was lower in FPH compared to CS and CG. *In vitro* DM disappearance was lower for FPH with respect to CG, however there were no differences ($P > 0.1$) between CS and FPH. FPH can be used in diets for sheep up to 75% of inclusion, without affecting intake and digestibility. The gas production technique allows the prediction of *in vitro* fermentation and rumen degradation, showing a lower fermentation with 25% inclusion of FPH.

Key words: Lambs; Productive behavior; Field pea hay; *in vitro* gas production.

INTRODUCCION

The apparent digestibility of foods is essential to establish its nutritional value and, therefore, for the formulation of rations in the ruminants. However, the determination of *in vivo* digestibility is a laborious and expensive process, requiring the use of large amounts of food, so different methods have been proposed for estimating *in vitro* (Bochi-Brum *et al.*, 1999). *In vitro* studies can be carried out with a large number of samples in a relatively short time, providing information on rates of digestion (Aimone *et al.*, 1977). The interest in using agricultural waste in feed for ruminants has been increasing worldwide in recent years, as the availability of grains is reduced (Fuentes *et al.*, 2001). There is a large amount of agricultural residues and agro-products (straw, stubble, stalks, etc.) that could be used as an alternative source of energy and protein in feed for ruminants. An example of these products is field pea hay (FPH) (*Pisum sativum*), which is left in the plot after harvesting pea pods without a ration as it would feed (Bastida García *et al.*, 2011). In Mexico's annual pea production is approximately 48031.76 ton met/ year, and the State of Mexico produces 8.13% of total production (<http://www.siap.gob.mx>), however, does not have a record of the remaining residue obtained after the last harvest, because not all waste is used for animal feed.

Some authors indicate a dry matter intake an efficient feed conversion and daily weight gain is similar when pea hay replaces cereals in growing and finishing diets of cattle (Reed *et al.*, 2004), but there are few studies in sheep (Bastida García *et al.*, 2011). It was reported that the nutritional characteristics of these feed resources depress feed intake, digestibility, rate of fermentation and microbial nitrogen supply (Mekasha *et al.*, 2003) and because nitrogen is a limiting nutrient in low-quality forages, supplementation with protein nitrogen sources or non-protein nitrogen have been used for the supply of ruminal ammonia level to meet the requirements of microbial protein (Fondevila and Barrios, 2001; Manyuchi *et al.*, 1997).

The aim of this study was to evaluate the productive performance of growing lambs fed different levels of inclusion of FPH and estimate rumen fermentation from *in vitro* gas production.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

The study was conducted in the Faculty of Veterinary Medicine at the Autonomous University of Mexico State, were used twenty Rambouillet lambs, with an average age of 5 months and 26.0 ± 0.43 kg BWi distributed homogeneously according to their weight in 4 groups of 5 animals each one. The animals were

housed at random to each of the 4 treatments (Table 1) to be evaluated by considering treatment as a witness and three inclusion levels of FPH (0%, 25%, 50% and 75%). Diets were iso-protein and iso-energy (13.26% CP and 8.8 MJ ME kg DM) based on forage (pea hay: FPH; corn stover: CS) and concentrate (Corn grain: CG, soybean meal, SBM and fishmeal: FM) supplemented with vitamins and minerals (Multitec of Malta ®), the chemical composition of the ingredients is presented in Table 2, diets were formulated according to the recommendations proposed by the AFRC (1996), meeting the needs of animals for their level of growth. The FPH used for this study was obtained from the field after the last harvest (3rd crop) seed pea. The FPH was milled using a hammer mill (mill Azteca, 5 mm Ø). The concentrate and forage ratios were mixed homogeneously to prevent the selection of ingredients, using a vertical mixing mill (mill Azteca).

Table 1. Proportion of ingredients used and chemical composition of experimental diets (g / kg DM) using different inclusion levels of pea hay.

Ingredient	Inclusion of pea hay			
	0%	25%	50%	75%
Pea hay	0.0	261.4	516.1	760
Corn stover	620	585.8	387.7	194
Corn grain	170	39.1	24.4	11.7
Fish meal	0.0	62.4	27.1	0
SoyBean Meal	170	40.4	21.7	0
Minerals ¹	40	34.3	34.3	34.3
Total	1000	1000	1000	1000
Chemical composition				
DM	935	920	920	930
OM	907	890	900	910
CP	110	107	113	119
NDF	562	513	529	510
ME MJ/kg DM ²	8.80	8.08	8.05	8.03

¹Multitec de Malta (1.0 kg DM) containing antioxidant 25 mg, calcium carbonate 4.5 g, salt 6 g, ionophore 30 g, zinc oxide 50 g, sodium bicarbonate 6 g, copper sulphate 6 g, ferrous sulphate 20 g, sodium sulphate 125 g, vitamins E 18 000 IU, A 3 000 000 UI, D 3 750 000 IU, potassium chloride 140 g, E.D.D. I ethylene-dynamine 0.500 g, cobalt carbonate 0.090 g, magnesium oxide 500 mg, manganese oxide 36 g, selenium 0.090 g

²Estimates from Ewing (1997), Young (2002).

Intake and apparent digestibility

Sheep were housed in metabolic cages (1.20 x 0.80 m) with an individual fed at 0800 and 1600 h and having free access to drinking water, food intake and the residues were weighed daily. The experimental period lasted 28 days, 21 days for diet adaptation and 7 days for sample collection. Samples of feces and urine were

collected daily in its entirety and they took 10%. The feces were placed in plastic bags and urine containers where there was a mixture of samples taken per animal and frozen at -20 °C for further analysis. After the experimental period proceeded to estimate voluntary food intake, food conversion, feed efficiency and digestibility.

Table 2. Chemical composition (g/kg DM) of the ingredients used in the present study.

	PH	CS	CG	FM	SBM
DM	910	930	890	930	920
OM	920	920	900	915	910
CP	80	36	89	592	460
NDF	636	670	141	-	120
ME, MJ/kg DM ¹	8.7	6.5	14.5	14.5	13.6

PH: Pea hay, CS: Corn stover, CG: Corn grain, FM: Fish meal, SBM: Soybean Meal

¹Estimates from Ewing (1997), Young (2002).

In vitro gas production

To determine the kinetics of ruminal degradation, it was used technique of *in vitro* gas production according to the method proposed by Menke et al. (1979) and modified by Theodorou et al. (1994). Approximately 0800 g DM of each ingredient and each diet mixtures were incubated in glass flasks with 90 ml of buffer solution and 10 ml of rumen fluid having a replica of three bottles per sample. Three Rambouillet lambs (BW 20 ± 0.5 kg) cannulated in rumen as a fluid donor, which were fed *ad libitum* (0900 and 1600 h) with a diet based on alfalfa hay and straw oats in a 50:50 ratio, to which was added 2% of a vitamin and mineral supplement. About 0.5 L of rumen fluid and 100 g of rumen solid (0830 h) were collected from each lamb, extracted and filtered in triple layer of gauze and cheese cloth, and was homogenized with CO₂ for five minutes, then were mixed and used as inoculum. The flasks were incubated in a water bath at 39 °C. The volume of gas was recorded at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h of incubation using a Delta brand pressure transducer (Model 8804 HD). After incubation the samples were filtered and dried (48 h, 65 °C) to measure the proportion of dry matter disappeared (DMD). Gas production at 96 h was correlated with dry matter disappeared for relative gas production (RGP: ml gas g DMD) (González Ronquillo et al., 1998).

Gas production was adjusted according to the model proposed by France et al. (1993) $y = A [1 - \exp(-b(t - T) - c(\sqrt{t} - \sqrt{T}))]$. Where: "y" is the cumulative gas production (ml) "t" is the incubation time (hours), A is the curve asymptote (total gas produced, ml), b (h⁻¹) c (h - 1/2) are the constants of gas produced, T is the

delay time (hours) that colonize the microorganisms to begin the fermentation. The values shown in Figures 1 and 2 were obtained from gas production split between the hours reading for each of the ingredients and diets.

Chemical composition

The DM content of feed, refusals and feces was determined in a forced air oven (60 °C, 48 h), and then milled (mill Willey, 3 mm Ø Arthur H. Thomas Philadelphia, PA) to determine organic matter (OM) AOAC (1991), and total nitrogen (N) by the kjeldahl procedure (AOAC, 1991), neutral detergent fiber (NDF) was determined according to Van Soest (1991) adding sodium sulfite and alpha amylase, using a digester fiber ANKOM. Urine samples were subjected to the determination of nitrogen (N) (AOAC, 1991). Residues from the *in vitro* incubation were dried (60 °C, 48 h) to determine the DM disappeared at 96 h.

Calculations and Statistical Analysis

Feed intake was the difference in the amount of feed offered and refused each day. The daily weight gain was calculated based animal weight every seven days until the completion of the experiment; the animals were weighed the morning before fasting the day before. Feed conversion was calculated by dividing the dry matter intake between daily gain and feed efficiency by dividing the daily weight gain between the daily intake. The relationship forage: concentrate ratio (F:C) was obtained considering the forage intake multiplied by 10 between the total intake (g /d) (Bastida Garcia et al., 2011).

To test *in vivo*, we performed an analysis of variance using a completely randomized design. $Y_{ijk} = \mu + T_j + \epsilon_{ijk}$. Where: μ is the overall mean, T is the effect due to treatment, ϵ is the experimental error.

For the *in vitro* study conducted an analysis of variance, which included treatment (n = 4) and repetition (3 rounds of incubation). The corresponding variance analysis was done using the GLM procedure of SAS program (1999). Comparisons between means were performed using Tukey's test (Steel and Torrie, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Intake and apparent digestibility

Table 1 shows the chemical composition of experimental diets. The content of CP for the FPH was similar to that found by Mekasha et al. (2003) who evaluated several products, including field pea, however, was less than that found by Garcia Bastida et al. (2011) using diets containing FPH, containing 16% CP at second cut, this last quotation that the court used

the second FPH. The NDF content was lower than found by Rotger *et al.* (2006) who in assessing digestibility FPH, mentioned a value of 82%, possibly due to containing a few pods and leaves because they came from three cuts of the product, however was higher than that found by Gilbery *et al.* (2007) using FPH diets for cattle. The content of CP and NDF in the CS was lower than found by Fuentes *et al.* (2001), who report a CP content of 490 g / kg DM and 724 g / kg DM of NDF, this may be due to lignification of hay to be packed, with respect to CG, CP content was less than reporting Oropeza *et al.* (1989) who found 12% in different hybrids of corn, however, about the NDF content is no different to that found in the present study with 1.4%.

The chemical compositions of experimental diets are presented in Table 1. The CP content was higher for 75% inclusion of FPH, being less than that found by Bastida *et al.* (2011) and Abdel-Magid *et al.* (2008) who found a concentration of 13.7% of CP using the same inclusion of FPH in diets for sheep. The NDF was higher for the control treatment, because it contained CS, however, the concentration of NDF in all treatments was higher than that found by Pol *et al.* (2009), Loe *et al.* (2004) and Bastida Garcia *et al.* (2011) who reported a concentration of NDF in the range of 381.6 to 553.7 g / kg DM.

The daily weight gain, feed efficiency and feed conversion (Table 3) were not affected by the inclusion of pea hay in the diet ($P > 0.1$), no clutch, although no significant difference, the animals were fed the diet containing 75% inclusion of FPH have a better efficiency compared to other treatments.

Table 3 shows the DM intake, which was lower than found by Loe *et al.* (2004) of 115 g/kg^{0.75}, and higher than that reported by Salawu *et al.* (2002), who reported 53.7 g/kg^{0.75} of intake. OM intake did not differ ($P > 0.1$) among treatments, while OM intake was increased with 25% inclusion of FPH, however, it was higher ($P < 0.05$) than that found by Salawu *et al.* (2002) using pea hay field third cut in diets for lambs with 52 g/kg^{0.75} of intake. The NDF intake showed no significant differences ($P > 0.1$) in treatments, however, differ from that found by Mekasha *et al.* (2002) using field peas in diets for lambs (49.24g/kg^{0.75}). With regard to the average values of ingestion (g/d) and balance and digestibility (g/100g) there were no significant differences ($P > 0.1$) among treatments.

In regard to digestibility of different treatments, DM digestibility was similar to that found by Mekasha *et al.* (2002) using FPH, digestibility of OM in the present study was lower than found by Gilbery *et al.* (2006) of 65% using field peas in diets for cattle. The digestibility of NDF was higher than found by

Meshaka *et al.* (2002) who found a digestibility of 45.8% using pea hay in diets for sheep, but differs from Reed *et al.* (2002) with a 75.5% digestibility of NDF when replacing 100% of the corn with field peas in diets for growing calves.

Nitrogen balance

The results obtained of nitrogen balance are shown in Table 4. N intake (g/d) was higher ($P < 0.05$) with the inclusion of 25% of FPH compared to 75%, without differences ($P > 0.1$) among other treatments, being higher than the found by Mekasha *et al.* (2002) and Salawu *et al.* (2002), who recorded a intake of 9.1 and 11.3 g N/d with field pea diets for lambs, this is because diets that included forage used only for their studies, which makes the N intake was less, however, the results obtained in this study were lower than found by Abdel-Magid *et al.* (2008) who reported a intake of 24.8 g N/d using diets for growing lambs. Fecal excretion shows no difference ($P > 0.1$) among treatments, being lower than found by Mekasha *et al.* (2002) and Abdel-Magid *et al.* (2008), with an excretion of 6.85 g N/d which assessed various agro-products including field pea, and 7.82 g N/d using FPH in diets for growing lambs, this may be that in this study used FM and SBM, which are used as protein source on passage to be better used in the intestine (Guada, 1993). The loss of N in urine did not differ ($P > 0.1$) in treatments being higher than that found by Mekasha *et al.* (2002) who show a loss of N of 1.13 g N/d, however, are less than Abdel-Magid *et al.* (2008) with an excretion of 11.97 g N/d. Regarding the N retained no differences ($P > 0.1$) among treatments. The diets used in this study were made isoenergetic and isoproteic for which there were no differences between intake and digestibility, coupled with a low concentration of CP and NDF in forages used. The minimum N excretion in urine and feces found in this study indicates a greater utilization of nutrients, which reduces environmental pollution (soil) excess N excreted into the environment, avoiding being made nitrous oxide (N₂O), which contributes to the greenhouse effect (Elizondo, 2006).

Table 3. Intake (g/d) and digestibility (g/100g) in growing lambs fed different levels of supplementation of pea hay.

Item	Pea hay inclusion				SEM	P-value
	0%	25%	50%	75%		
No. of animals	5	5	5	5		
Live weight (kg)	26.4	26.5	25.8	26.0	0.37	NS
DGW (g/d)	132.6	143.4	140.0	143.5	13.0	NS
Feed conversion	7.0	7.2	6.8	6.2	0.6	NS
Feed efficiency	0.144	0.138	0.146	0.162	0.01	NS
Intake (g/d)						
Field pea intake	0.0 ^d	270.7 ^c	494.1 ^b	671.3 ^a	18.9	0.001
Total Roughage intake (R)	571.6 ^b	877.4 ^a	865.3 ^a	842.7 ^a	28.1	0.001
Total Concentrate intake (C)	350.3 ^a	182.5 ^b	102.9 ^c	40.6 ^d	13.0	0.001
R:C ratio	6.2:3.8 ^b	8.5:1.5 ^a	9.0:1.0 ^a	9.5:0.5 ^a	0.03	0.001
DM	922.0	1035.6	957.4	883.3	13.6	NS
OM	839.0	921.7	861.7	803.8	11.1	NS
NDF	562.4	621.4	593.6	556.5	7.6	NS
Digestibility (g/100 g)						
DM	47.8	52.6	51.6	49.4	1.08	NS
OM	51.8	54.3	54.9	47.7	1.64	NS
NDF	54.6	56.6	60.0	56.9	1.11	NS

DWG, Daily Weight Gain (g/d); SEM, standard error of the mean. NS, not significant (P>0.1)

Table 4. Nitrogen balance (g / d) in growing lambs fed different levels of supplementation of pea hay.

	Pea hay Inclusion				SEM	P-value
	0%	25%	50%	75%		
N Intake	16.2 ^{ab}	16.8 ^a	15.3 ^{ab}	15.7 ^b	0.33	0.05
N Excretion						
Feces	4.3	4.7	4.3	4.4	0.09	NS
Urine	6.1	6.5	6.4	5.8	0.16	NS
N Balance	5.8	6.4	7.9	5.8	0.49	NS

^{abc} Means with different literal in the same row are statistically different (P <0.05), NS, not significant (P > 0.1). SEM, standard error of the mean.

In vitro gas production

Table 5 presents the parameters of gas production adjustment obtained *in vitro* incubation of the different ingredients used in the experimental diets, which shows that the fraction A (ml gas / g DM incubated) was lower for FPH with respect to CS and CG, the latter who showed the increased production of gas. The fraction b (h⁻¹) was higher (P <0.05) in FPH compared to the other ingredients, however there were no differences (P>0.1) between CS and FM for the fraction c (h^{1/2}). The lag time phase, FM and SBM had a higher start of fermentation compared to the other ingredients. Relative gas production (ml gas / g DMD) was lower in FPH compared to CS and CG. The DMD *in vitro* was lower for PH with respect to CG, but no differences (P>0.1) between CS and FPH, on the other hand, the DMD between CS and FM were not significantly different (P>0.1). The ability of rumen bacteria to degrade to a greater extent than the structural soluble carbohydrates (fodder) has been

evidenced in the literature, as reflected in the production levels of gas or DMD (Bastida Garcia et al. 2011). Relative gas production was lower (P<0.001) in FPH compared to the other ingredients, with the CG that has the highest amount of gas production.

Figure 1 shows the gas production of up to 96 hours of the ingredients used in the experimental diets, SBM results in increased production of gas to the first 3 h and found no difference (P>0.1) between remaining ingredients, at 3 and 6 h the CS showed a higher production compared to the other ingredients, this is due to the maturation stage of the cut stubble as the first cut, the leaves and stems contain a number low fiber which indicates containing rapidly fermentable soluble components in these parts (leaves and stems) so it has a higher gas production in the early hours of fermentation and then decline rapidly (Tolerates et al., 1999), from 12 h onwards, the largest gas production is presented by the CG. The low gas production of the CG in the initial time of incubation compared with the

other ingredients is due to increased slowly fermentable carbohydrate (Hamid *et al.*, 2007), but the production of the FPH although it was lower compared to CS and CG has a constant gas production, this may be related to the content of hemicellulose in FPH, which is more available than in the CS which presents unions linked to the lignin that makes it less digestible (Bach *et al.*, 2006). The FM gas production shows a lower gas production with respect to other ingredients used, this may be due to increased temperature during preparation, in which the proteins are denatured by breaking hydrogen bonds and disulfide bonds responsible for their secondary structure, the result of the distortion, reduces the solubility of the protein as well as susceptibility to degradation and rumen fermentation (Guada, 1993).

Table 6 shows the fermentation parameters of the different levels of inclusion of FPH in the diets, showing that the total gas production for 25% FPH was lower compared to the control diet (0% FPH). The average rate of degradation (h) shows that 50% of FPH was lower ($P < 0.05$) compared to other treatments, but no significant differences ($P > 0.1$) between 25 and 75%. For the fraction $h^{1/2}$ and lag time there were no differences ($P > 0.1$) between treatments. It has been shown that the production of gas is related to the disappearance of the NDF (Nsahlai *et al.*, 1995) and about Pell *et al.* (1997) found that the relationship between variables is linear with a slope remarkably constant. Also found a high correlation between *in vitro* gas production and availability of starch in cereal

grains (Posadas *et al.*, 2005). Gas production was higher on the diet containing 50% of FPH compared with other treatments, while the diet containing 25% of FPH inclusion had the lower value. For the DMD no differences were found ($P > 0.1$) between treatments.

Figure 2 shows the gas production at different levels including the FPH, it was noted that gas production at 3, 6 and 9 h of incubation was higher ($P > 0.1$) in the treatment that no containing FPH (0%) compared with the other diets, the production of gas at 3 h shows no significant difference ($P > 0.1$) between treatments containing 25, 50 and 75% inclusion of FPH, with respect to the 6 h gas production was lower ($P > 0.1$) for the diet containing 50% compared with 25 to 75% of FPH which show no significant differences ($P > 0.1$), compared to 12 hours of incubation, there was no significant differences ($P > 0.1$) among treatments, the production of gas from 24 h onwards was lower ($P > 0.1$) for the diet containing 25% of FPH with respect to the 50 and 75%. Usually as the starch in corn is more digestible than the NDF is expected that the substitution of concentrate feed by resulting in an increase in total digestibility of the ration, thus an increase in the fermentation as in diet with 25% inclusion of FPH, without clutch, although the potential for fiber digestibility of grasses is higher, the high rate of passage through the rumen resulting in higher effective fiber digestibility in legumes in grasses (Bach *et al.* 2006; Guada, 1993; Hoffman *et al.*, 2007).

Table 5. Gas production parameters obtained from the *in vitro* incubation of adjustment and digestibility of the ingredients used in the diets, using the model proposed by France *et al.* (1993).

Item	FPH	CS	CG	FM	SBM	SEM	P-value
A	94.8 ^d	118.2 ^c	229.7 ^f	210.1 ^g	206.00 ^g	3.79	0.001
b	0.187 ^d	0.072 ^c	0.088 ^c	0.004 ^f	0.001 ^f	0.008	0.001
c	-0.287 ^d	-0.122 ^d	-0.244 ^d	-0.109 ^d	-0.111 ^d	0.05	NS
T	2.31 ^d	2.46 ^d	3.91 ^d	2.66 ^c	2.41 ^c	0.78	0.001
DMD _{96h}	59.71 ^c	61.79 ^{de}	66.72 ^d	66.12 ^d	66.33 ^d	1.08	0.01
RGP	158.7 ^f	191.26 ^c	344.27 ^d	317.69 ^g	310.56 ^g	5.4	0.001

^{abcde} Means with different literal in the same row are statistically different ($P < 0.05$), NS, not significant ($P > 0.1$); SEM, standard error of the mean.

A total gas production (ml gas / g DM incubated); b, fermentation rate (h^{-1}), c, fermentation rate ($h^{-1/2}$) T, Lag Time (the time in which start the fermentation). DMD_{96h}, DM disappeared at 96 h (mg/100 mg), RGP (ml gas_{96h} / g DMD_{96h})

PH: pea hay, CS: corn stover, CG: corn grain, FM: fish meal, SBM: soybean meal.

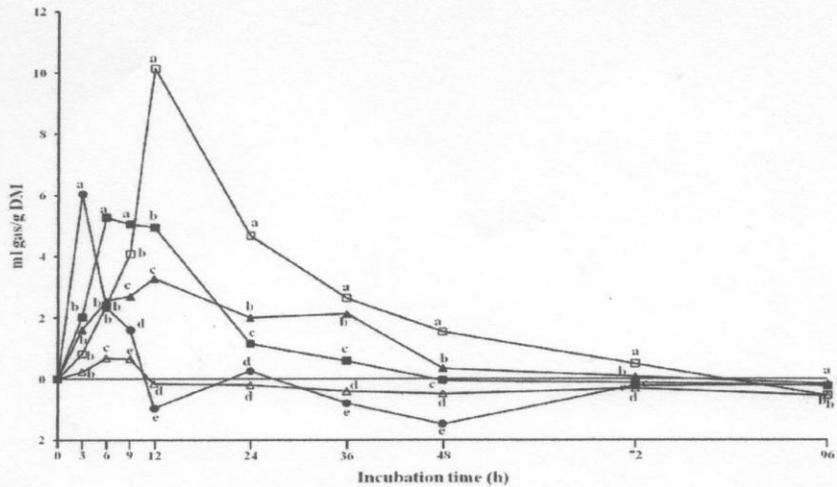


Figure 1. The curves of gas production per hour (ml gas / g DM) of ingredients used in the experimental diets (▲, pea hay, ■, corn stover, △, Fish meal; □, corn grain, *, Soybean Meal). ^{abcdc} different letters at the same time (P <0.05).

Table 6. Gas production parameters obtained *in vitro* incubation of adjustment and digestibility of the different inclusion levels of pea hay in the diets, using the model proposed by France et al. (1993).

Item	Pea hay inclusion				SEM	P-value
	0%	25%	50%	75%		
A	216.81 ^d	161.55 ^e	211.75 ^{dc}	187.58 ^{dc}	12.67	0.01
b	0.0507 ^{ef}	0.0661 ^d	0.0427 ^f	0.0605 ^{de}	0.0051	0.001
c	-0.0492	-0.0525	-0.0270	-0.0490	0.0058	NS
T	1.2740	0.9434	0.7927	0.9489	0.1014	NS
DMD _{96h}	61.85	62.76	62.66	58.55	1.51	NS
RGP	350.54 ^d	257.40 ^d	377.93 ^e	320.37 ^f	7.06	0.001

A, total gas production (ml gas / g DM incubated); b, fermentation rate (h⁻¹), c, fermentation rate (h^{-1/2}) T, Lag Time (the time in which start the fermentation). RGP, relative gas production (ml gas 96h / g DMi); DMD_{96h}, DM disappeared 96 h (mg / 100 mg). Means with different literal in the same row are statistically different (P <0.05), NS, No significant (P > 0.1). SEM, standard error of the mean.

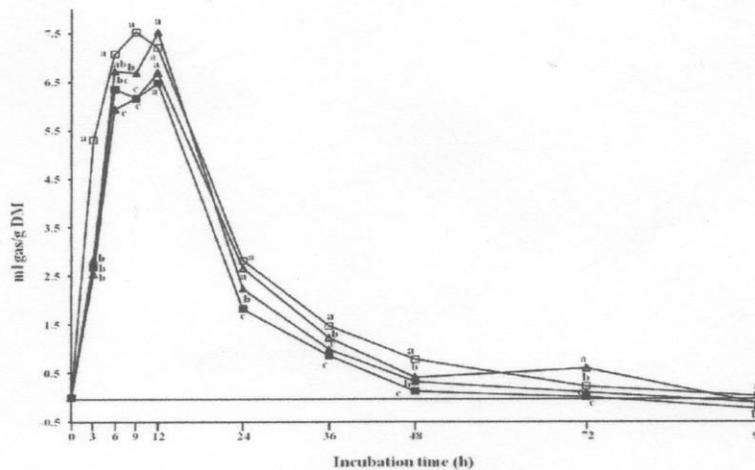


Figure 2. Production curves of gas per hour (ml gas / g DM) of diets used different inclusion levels of pea hay (□ 0% ■ 25%, 50% △, ▲ 75%). ^{abc} Different letters to the same time are statistically different (P <0.05).

CONCLUSIONS

Pea hay can be used in diets for sheep up to 75% inclusion, without affecting intake and digestibility. The method of *in vitro* gas production is a useful tool for selecting ingredients for balancing rations, and the data obtained from the digestibility provide an adequate and reliable estimate of the nutritional quality of food.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the CONACyT through project No. I 37 568-B, the Universidad Autonoma del Estado de Mexico (UAEM) and Fundación Produce State of Mexico. The MC Jorge Luis Bastida and Ulises Alejandro González García were funded by a grant from CONACyT.

REFERENCES

- Abdel-Magid, S.S., Abd El-Rahman, H.H., Mohamed, M.I. and Awadalla, I.M. 2008. Utilization of Chick Pea Straw and Pea Straw in Feeding Growing Rahmani Lambs. *Journal of Agriculture and Environment Science*. 4 (2):214-217.
- Aimone, J.C. and Wagner, D.G. 1977. Micronized Wheat. II. Influence on *in vitro* Digestibility, in *Vitro* Gas Production and Gelatinization. *Journal of Animal Science*. 44:1096-1099.
- Bochi-Brum, O., Carro, M.D., Valdés, C., González, J.S. and López, S. 1999. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: effect of the diet of donor animals. *Archivos de Zootecnia*. 48:51-61.
- Bastida Garcia.J.L., González Ronquillo, M., Dominguez, V.I.A., Romero, B.J. and Castelán, O. O. 2011. Effect of field pea (*Pisum sativum* L.) level on intake, digestion, ruminal fermentation and *in vitro* gas production in sheep fed maintenance diets. *Animal Science Journal Japanese*. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00884.x (in press).
- Bach, A. and Calsamiglia, S. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿Química o física? XXII Curso de especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA).
- Elizondo, S. J. 2006. El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*. 19:69-77.
- Ewing, W.N. 1997. *The Feeds Directory. Commodity Products Guide.* Context Publications, Santa Rosa, CA. pp. 118
- Fondevila, M., Barrios, U.A. 2001. La técnica de producción de gas y su aplicación al estudio del valor nutritivo de los forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35:197-206.
- Fuentes, J., Magaña, C., Suarez, L., Peña, R., Rodríguez, S., Ortiz de la Rosa, B. 2001. Análisis químico y digestibilidad "*in vitro*" de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.). *Agronomía Mesoamericana*. 002:189-192.
- Gilbery, T.C., Lardy, G.P., Soto-Navarro, S.A., Bauer, M.L. and Anderson, V.L. 2007. Effect of field peas, chickpeas, and lentils on rumen fermentation, digestion, microbial protein synthesis, and feedlot performance in receiving diets for beef cattle. *Journal of Animal Science*. 85:3045-3053.
- Guada, J.A. 1993. Efectos del procesado sobre la degradabilidad ruminal de la proteína y almidón. IX Curso de especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA. Barcelona).
- Hamid, P., Akbar, T., Hossein, J. and Ali, M.G. 2007. Nutrient Digestibility and Gas Production of Some Tropical Feeds Used in Ruminant Diets Estimated by the *in vivo* and *in vitro* Gas Production Techniques. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2:108-113.
- Loe, E.R., Bauer M. L., Lardy, G.P., Berg, P.T. and Moore, B.L. 2000. Effect of field pea (*Pisum sativum*) replacement of corn in lamb finishing diets. *Small Ruminant Research*. 3:39-45.
- Loe, E.R., Bauer, M.L., Lardy, G.P., Caton, J.S. and Berg, P.T. 2004. Field pea (*Pisum sativum*) inclusion in corn-based lamb finishing diets. *Small Ruminant Research*. 53:39-45.
- Manyuchi, B., Hovell, F.D., Ndlovu, L.R., Topps, J.H., Tigere, A. 1997. The use of groundnut hay as a supplement for sheep consuming poor quality natural pasture hay. *Animal Feed Science and Technology*. 69:17-26.
- Mekasha, Y., Tegegne, A., Yami, A., Umunna, N.N. and Nsahlai, I.V. 2003. Effects of supplementation of grass hay with non-conventional agro-industrial by-products on rumen fermentation characteristics and microbial nitrogen supply in rams. *Small Ruminant Research*. 50:141-151.
- Mekasha, Y., Tegegne, A., Yami, A. and Umunna, N.N. 2002. Evaluation of non-conventional agro-industrial by-products as supplementary feeds for ruminants: *in vitro* and metabolism study with sheep. *Small Ruminant Research*. 44:25-35.
- Menke, K.H. and Steingass. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical

- analyses and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28:7-55.
- Mosier, A.R., Duxbury, J.M., Freney, J.R., Heinemeyer, O., Minamik, K. 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation. *Plant and Soil*. 181: 95-108.
- Nsahlai, I.V., Umunna, N.N. and Negassa, D. 1995. The effect of multi-purpose tree digesta on in vitro gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69:519-528.
- Hoffman, P.C., Lundberg, K.M., Bauman, L.M., Randy, D. Sha., Contreras-Govea, E.F. 2007. Digestibilidad in vitro del FDN (fibra detergente neutro): El debate de 30 vs 48 horas. Focus on Forage. 5:16-20.
- Oropeza, E.; Ortiz de Bertorelli, L. 1989. Evaluación nutricional de la proteína del grano de seis cultivares de maíz (*Zea mays* L.). revista de la facultad de agronomía-UCV (Maracay). 15:225-234.
- Pell, A.N., Doane, P.H. and Schofield, P. 1997. In vitro digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, GC, pp.109 - 132.
- Pol, M.V., Hristov, A.N., Zaman, S., Delano, N. and Schneider, C. 2009. Effect of inclusion of peas in dairy cow diets on ruminal fermentation, digestibility, and nitrogen losses. *Animal Feed Science and Technology*. 15:95-105.
- Posada S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Liv. Res. Rural Development* 17:36. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>. (Consulta: Enero 2010).
- Reed, J.J., Lardy, G.P., Bauer, M.L., Gilbery, T.C. and Caton, J.S. 2004. Effect of field pea level on intake, digestion, microbial efficiency, ruminal fermentation, and in situ disappearance in beef steers fed forage-based diets. *Journal of Animal Science*. 82:2185-2192.
- Reed, J.J., Lardy, G.P., Bauer, M.L., Gilbery, T. C., and Caton, J.S. 2004. Effect of field pea level on intake, digestion, microbial efficiency, ruminal fermentation, and in situ disappearance in beef steers fed growing diets. *Journal of Animal Science*. 82:2123-2130.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S. and Manteca, X. 2006. In situ degradability of seven plant protein supplements in heifers fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology*. 125: 73-87.
- Salawu, M.B., Adesogan, A.T., Fraser, M.D., Fychan, R. and Jones, R. 2002. Assessment of the nutritive value of whole crop peas and intercropped pea-wheat bi-crop forages harvested at different maturity stages for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 96:43-53.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Informe 2009. Producción Nacional Annual de Chicharo. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350.(Consulta: Julio 2011.)
- Tacon, A.G.J., 1997. Fishmeal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses - a limiting factor for the aqua feed green revolution? In: Tacon, A., Basurco, B., (Eds.), *Feeding Tomorrow's fish. Cahiers Options Mediterraneennes 22*. Institut Agronomique Mediterranee de Zaragoza, Spain, pp. 153-182.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48:185-197.
- Tolera, A. and Sundstól, F. 1999. Morphological fractions of maize stover harvested at different stages of grain maturity and nutritive value of different fractions of the stover. *Animal Feed Science and Technology*. 81:1-16.
- Young, N.E. 2002. *The Forages and Protein Crops Directory*, pp. 25. Context publications, Leicestershire, UK

Submitted April 11, 2011 – Accepted July 08, 2011
Revised received August 23, 2011

Tropical and Subtropical Agroecosystems

[Journal Help](#)

[HOME](#) [ABOUT](#) [USER HOME](#) [SEARCH](#)

[CURRENT](#) [ARCHIVES](#) [ANNOUNCEMENTS](#)

LANGUAGE

(English ▾)

FONT SIZE

INFORMATION

- [For Readers](#)
- [For Authors](#)
- [For Librarians](#)

Home > User > Author > Submissions > #1664 > Summary

#1664 Summary

[SUMMARY](#) [REVIEW](#) [EDITING](#)

Submission

Authors [Ulises A Gonzalez Garcia](#), [Manuel Gonzalez Ronquillo](#), [Luis Corona-Gochi](#), [Julieta G Estrada Flores](#)

Title Comparación de técnicas in vivo, in vitro e in sacco en la determinación ruminal e intestinal del grano de maíz (Zea maíz) y sorgo (Sorghum bicolor L. Moench).

Original file [1664-7214-1-SM.DOC](#) 2012-08-19

Supp. files [1664-7216-1-SP.DOC](#) 2012-08-19 [ADD A SUPPLEMENTARY FILE](#)

Submitter [Dr Manuel Gonzalez Ronquillo](#) 

Date submitted August 19, 2012 - 05:59 AM

Section Research Papers

Editor [Carlos Sandoval Castro](#) 

Author comments El presente manuscrito presenta una comparacion de los granos de maiz y sorgo en cuanto a su digestibilidad en el TGI mediante la utilizacion de diferentes tecnicas

Status

Status In Review

Initiated 2012-08-19

Last modified 2012-09-12

Submission Metadata

[EDIT METADATA](#)

Authors

Name [Ulises A Gonzalez Garcia](#) 

Affiliation Universidad Autónoma del Estado de México.

Country Mexico

Bio statement Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Name [Manuel Gonzalez Ronquillo](#) 

Affiliation Universidad Autonoma del Estado de Mexico

Country Mexico

Bio statement UAEMex, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Nutricion animal. Profesor investigador

[Principal contact for editorial correspondence](#)

USER

You are logged in as...

gozan037

- [My Journals](#)
- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active](#) (4)
- [Archive](#) (8)
- [New Submission](#)

JOURNAL CONTENT

Search

(All ▾)

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)
- [Other Journals](#)

KEYWORDS

[Digestibility](#)
[Guazuma ulmifolia](#) [Land use](#) [Phaseolus vulgaris L.](#) [Prevalence](#) [Trichoderma spp.](#)
[abundance](#) [biological](#) [control](#) [digestibility](#) [diversity](#) [fatty acids](#) [goats](#) [lactation](#) [land use](#) [maternal effects](#) [performance](#) [risk factors](#) [ruminants](#) [season](#) [sheep](#) [sustainability](#)

Comparación de técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in sacco* en la determinación ruminal e intestinal del grano de maíz (*Zea maíz*) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench).

Ulises Alejandro González García¹, Luis Corona Gochi³, Julieta Gertrudis Estrada Flores²,
Manuel González Ronquillo^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario 100 Ote. Toluca. Mexico. 50000 ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

e-mail: mrg@uaemex.mx

Resumen.

Los granos de cereales son procesados antes de la alimentación del ganado, por lo cual, se han adoptado varios métodos para mejorar la utilización de los cereales para la industria ganadera, incluyendo la reducción en el tamaño de partícula, la cual puede realizarse mediante el molido o rolado seco. Se realizó una comparación de técnicas *in vivo*, *in vitro* (*Produccion de gas y Daisy*) e *in sacco* en la determinación ruminal e intestinal del grano de maíz (*Zea maíz*) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). El sorgo presenta el mayor (P<0.01) contenido de almidón, mientras que la FND fue mayor (P<0.01) para el maíz, la MSd fue similar (P=0.93) para ambos cereales, la digestión de la PC fue mayor (P<0.01) para el sorgo con respecto al maíz, mientras que para la PNDR y PDI no se encontraron diferencias (P>0.05) entre cereales. Con lo que respecta a los métodos de digestibilidad, la MSd fue menor (P<0.01) para el *in vivo* con respecto al resto de los métodos, la digestión de la PC tanto en rumen como en intestino fue mayor (P>0.01) para los métodos *in sacco* e *in vitro* (*Daisy*). La producción de AGV'S fue similar para ambos cereales. Las características antes mencionadas demuestran que el sorgo puede ser utilizado como una alternativa al sustituir el maíz en las dietas para rumiantes.

Palabras clave: *in vivo*, *in sacco*, proteína degradable en rumen, proteína digestible en intestino, Producción de gas *in vitro*.

Introducción.

Los granos de cereales son procesados antes de la alimentación del ganado, debido a que un pericarpio intacto impide la adhesión de las bacterias para su digestión, por lo cual, se han adoptado varios métodos para mejorar la utilización de los cereales para la industria ganadera, incluyendo la reducción en el tamaño de partícula, la cual puede realizarse mediante el molido o rolado seco (DePeters et al., 2003; Al-Rabadi et al., 2011). Las características físicas y químicas de los gránulos de almidón de los cereales son muy complejas. El maíz a diferencia de la cebada, contiene una región de endospermo harinoso y vítreo. Los gránulos en el endospermo harinoso son más susceptibles al procesamiento del grano y a la digestión enzimática ya que están envueltos por una capa delgada de matriz protéica en contraste con la capa que envuelve al endospermo corneo o vítreo (DePeters et al. 2007). El grano de sorgo es una fuente importante de energía en la dieta, ya que al igual que otros cereales es rico en almidón, el cual es comparable con el maíz (Ezeogu et al. 2005). Sin embargo, la mayor limitante es su baja digestibilidad debido a la densa capa de matriz proteica en el endospermo periférico del núcleo, que impide la digestión de los gránulos de almidón en el rumen (Abdelhadi et al. 2006). Las ventajas de la manipulación de los cereales podría mejorar las condiciones ruminales mediante el suministro de más energía, lo cual puede lograrse mediante el suministro de almidón altamente degradable (Alvarez et al. 2001). Estudios relacionados con los efectos del procesamiento en la alteración del almidón y la proteína de los cereales y su utilización se pueden clasificar en tres categorías: 1) rendimiento y eficiencia en el aprovechamiento del alimento; 2) las mediciones *in vitro* en los cambios estructurales del almidón, los índices de fermentación microbiana ruminal o degradación enzimática y 3) en las determinaciones ruminal, posruminal y total *in vivo* (DePeters et al., 2003). Debido a que, en los estudios *in vivo* los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales, actualmente existen numerosos análisis de laboratorio para estimar la digestión ruminal e intestinal de la proteína (Calsamiglia et al. 1995; Gargallo et al. 2006) utilizando varios procedimientos enzimáticos los cuales son simples y de costo razonable comparado con los métodos *in vivo* (Danesh Mesgaran et al., 2005). La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou et al., 1994). Una ventaja de

este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell et al., 1993). El método *in sacco*, tiene como objetivo fundamental proporcionar estimativas de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes de los alimentos sometidos al efecto del ambiente ruminal (Olivera, 2001). El sistema Daisy^{II} (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU) se utiliza como método alternativo para calcular la degradación *in vitro* del alimento en el rumen e intestino en condiciones de laboratorio. Por otra parte; la tasa de digestión de los nutrientes de un alimento varía inversamente con el tamaño de partícula, este efecto es más evidente en granos de baja degradabilidad ruminal como el sorgo y el maíz, ya que en función del tipo de procesamiento y de la dieta acompañante, puede modificarse el sitio de digestión de los granos (Ramos et al., 2009; Al-Rabadi et al., 2011). El objetivo del presente estudio fue estimar la composición química, la producción de gas *in vitro* y la degradación de la proteína a nivel ruminal e intestinal a partir de métodos *in vivo*, *in sacco* e *in vitro*, utilizando granos de sorgo o maíz y su comparación entre ellos.

Material y métodos

Procesamiento de maíz y sorgo

Se obtuvieron muestras de maíz y sorgo de un lote comercial, el cual contenía los granos enteros y cantidades insignificantes de granos partidos. Para un correcto procesamiento los granos enteros fueron quebrados (Molino azteca[®], 1 mm Ø) para asegurar un tamaño de partícula homogéneo en ambas muestras. Posteriormente se tomaron 1000 g de cada muestra para análisis posteriores.

Tamaño de partícula

Para la determinación de tamaño de partícula, se utilizaron 100 g de cada cereal por duplicado en un agitador W.S TYLER 8570 (Mod. RX-812) con cribas del número 6 (3.360 mm), 7 (2.830 mm), 10 (2.000 mm), 20 (0.840 mm), 30 (0.590 mm), 40 (0.420 mm), con un tiempo de agitación de 10 minutos por cada tratamiento (Ensor, 1970) por triplicado.

Evaluación *in vivo*

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) canulados en rumen y duodeno, los cuales fueron alimentados con uno de dos tratamientos maíz y sorgo. Los animales fueron alimentados a las 0800 y 2000 h al 2 % PV, con acceso libre al agua. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d para adaptación a las dietas y 5 d para la recolección de muestras. Las dietas se utilizaron (Cuadro 1) con un 73% de inclusión en MS de cada uno de los tratamientos y el resto (% MS) fue a base de melaza de caña (5%), urea (1%), sales minerales (0.05%), heno de avena (12%) y heno de alfalfa (6%), para cubrir sus necesidades de mantenimiento (NRC, 1996). Se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) al 0.40% de inclusión en el suplemento como marcador de flujo (Corona et al., 2005). Se tomaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 ml/ hora de muestreo), por cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350 h, el día 17 a las 0900 y 1500 h, el día 18 a las 1050 y 1650 h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Evaluación *in situ*

Se utilizaron dos bovinos de raza holstein (PV 300 ± 50 Kg) con cánula ruminal permanente para determinar la digestibilidad de la MS y la proteína (PC) de acuerdo a la técnica descrita por Ørskov y McDonald (1979). Los animales fueron alimentados *ad libitum* (0800 y 1600 h), con una dieta que contenía 60% heno de avena y 40% concentrado a base de sorgo y soya (15% PC, 12.56 MJ EM/ kg MS). Se pesaron 5 g MS de muestra y fueron colocados en bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 µm), para posteriormente ser sometidas a 24h de incubación ruminal por triplicado, posteriormente las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad ruminal *in vitro*

Las muestras de grano fueron incubadas *in vitro*, para la cual se preparó un medio de cultivo de acuerdo a la metodología descrita por Daisy^{II} (Ankom Technology – 11/00), que

consta de dos soluciones buffer: solución A: KH_2PO_4 (10 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/l), NaCl (0.5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), Urea (grado reactivo; 0.5g/l); solución B: NaCO_3 (15 g/l) y $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1g/l). El medio de cultivo se realizó en una proporción de 4:1 (medio de cultivo: líquido ruminal) a una temperatura de 39° C, agitando la solución para permitir una mezcla uniforme. El líquido ruminal se obtuvo de los dos bovinos fistulados mencionados anteriormente. Se utilizaron 24 bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μm) depositando en cada una de ellas 5 g MS de muestra. Los granos fueron incubados por 24 h, depositando tres bolsas por jarra, realizándose dos repeticiones. Pasado el tiempo las bolsas fueron lavadas con agua hasta que el agua escurrió limpia, para después ser secadas en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad intestinal *in vitro*

Los residuos obtenidos de la digestión *in vitro* (Daisy^{II}) e *in situ* fueron sometidos a una digestión intestinal (pepsina-pancreatina), de acuerdo al método descrito por Gargallo et al. (2006). En cada una de las jarras de digestión se incubaron al azar ocho replicas (bolsas Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μm) por tratamiento (4 bolsas/jarra con 2 g MS de muestra), incluyendo un blanco, con el fin de generar el factor de corrección; se introdujeron dentro de cada jarra que contenía una solución de 2 L de HCl al 0.1 N ajustada a un pH de 1.9 con 1 g/L de pepsina (P-700), permaneciendo por un tiempo de 1 h a una rotación constante a 39 °C. Pasado ese tiempo, las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia, posteriormente fueron depositadas dentro de las jarras de incubación (4 bolsas/jarra) los cuales contenían 2 L de una solución de pancreatina (con una solución buffer de KH_2PO_4 al 0.5M ajustada a un pH de 7.75) conteniendo 50 ppm de timol y 3 g/L de pancreatina (P-7545, Sigma), y permanecieron a una rotación circular constante a 39 °C durante 24 h. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Producción de gas *in vitro*

Para determinar la cinética de degradación ruminal se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo al método descrito por Theodorou et al. (1994) y Mauricio et al.

(1999). Aproximadamente 0.800 g MS de cada ingrediente fueron incubados en botellas de vidrio con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal teniendo una réplica de tres botellas por muestra. El líquido ruminal fue colectado de dos bovinos de raza Holstein (500 ± 10 kg PV). De cada bovino se colectó una cantidad aproximada de 0.5 L de líquido ruminal y 100 g de sólido previo a la alimentación (0730 h) de los animales y filtrado en triple capa de gasa y lana de vidrio, se homogenizó con CO₂ durante cinco minutos, posteriormente fueron mezclados y utilizados como inóculo. Las botellas fueron incubadas en un baño de agua a 39°C. El volumen de gas fue registrado a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 h de incubación (Streeter et al., 1993) por medio de un transductor de presión marca Delta (Modelo HD 8804). Una vez finalizado el periodo de incubación, se tomó una muestra de contenido de los frascos para posteriores análisis y las muestras fueron filtradas y secadas (48 h, 65 °C) para determinar la proporción de materia seca desaparecida (MSd). La producción de gas a las 24 h se correlacionó con la materia seca desaparecida para obtener la producción de gas relativa (PGR, ml gas g⁻¹ MSd) (Gonzalez Ronquillo et al., 1998).

Análisis de laboratorio

A las muestras iniciales se les determinó el contenido de materia seca (MS) en una estufa de aire forzado (60 °C, 48 h), posteriormente se molieron (molino Wiley, 1 mm Ø) para determinar Cenizas (600° C por 3 h), y su diferencia para Materia Orgánica (MO), así como el contenido de aNDF-NDF (Goering y Van Soest, 1970) utilizando alfa amilasa (ANKOM FAA), se determinó el N utilizando el método Kjeldahl (AOAC, 1991) y la proteína cruda (PC) fue calculada como N X 6.25. Para la determinación de energía bruta (EB) se utilizó una bomba calorimétrica adiabática PARR[®] (Gallenkamp, Automatic Adiabatic Bomb). La digestión del marcador (Cr) se realizó mediante la técnica descrita por Hill y Anderson (1958), posteriormente la concentración del marcador (Cr₂O₃) en duodeno y heces se determinó por espectrofotometría de absorción atómica, después de la solubilización de las muestras incineradas (Siddons et al., 1985).

Todos los residuos de las muestras (maíz y sorgo) utilizadas en las pruebas de incubación ruminal y pepsina-pancreatina, así como los residuos de producción de gas fueron analizados para MS (60° C, 48 h, en una estufa de aire forzado) y N (método Kjeldahl;

AOAC, 1991). La PDI no fue determinada en los residuos de producción de gas debido a que no fue suficiente.

Una vez finalizado el tiempo de lectura de cada periodo de incubación de la Producción de gas *in vitro*, se registró la lectura de pH (Conductronic pH 130) a cada frasco, posteriormente se filtro el líquido y se tomaron 5 ml para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV'S) por el método propuesto por Jouany (1982) utilizando el 4-metil valérico como marcador interno, y 10 ml a los cuales se les adicionó 3.5 ml de HCl para la obtención de N-NH₃ (Weatherburn, 1967). La producción de metano se calculó de acuerdo al modelo descrito por Wolin (1960).

Cálculos

Para el cálculo de tamaño de partícula se utilizó la siguiente fórmula

$$d_{gw} = \log^{-1} \frac{\sum(W_i \log d_i)}{\sum W}$$

$$S_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum W_i (\log d_i - \log d_{gw})^2}{\sum W} \right]^{1/2}$$

Donde: d_i = Diámetro de la abertura de la malla de i^{th} criba, d_{i+1} = Diámetro del tamaño de la próxima criba que i^{th} es la criba (justo sobre el grupo), d_{gw} = Diámetro de la media geométrica, d_i = Diámetro geométrico de la partícula en i^{th} criba., i^{th} criba = $[d_i \times d_{i+1}]^{1/2}$, S_{gw} = Desviación estándar geométrica.

Digestibilidad *in vivo*

La digestión del N se calculó mediante la siguiente fórmula (Faichney, 1975):

Digestibilidad ruminal del nutriente =

$$100 - 100 \left[\frac{(\% \text{ marcador en el alimento} / \% \text{ marcador en duodeno}) \times (\% \text{ de nutriente en duodeno} / \% \text{ de nutriente en alimento}) \right]$$

Digestibilidad *in vivo*, *in vitro* (Daisy^{II}) e *in sacco*

La materia seca desaparecida fue calculada mediante la siguiente fórmula:

Digestibilidad del nutriente =

$$[(\text{Consumo del nutriente} - \text{nutriente en heces}) / \text{consumo del nutriente}] \times 100$$

Digestibilidad intestinal

In vitro

La digestión pepsina-pancreatina del N se calculó como: el N en la muestra original menos el N restante después de la incubación pepsina-pancreatina dividido por el N de la muestra original (Gargallo et al., 2006).

In vivo

La digestión intestinal del N se calculó mediante la siguiente fórmula:

Digestibilidad del nutriente =

$$[(\text{g nutriente que entra al intestino} - \text{nutriente en heces}) / \text{g nutriente que entra al intestino}] \times 100$$

Producción de gas *in vitro*

La producción de gas se estimó en ml/gas por hora, así mismo se ajustó al modelo propuesto por France *et al.* (1993) $y = a [1 - \exp(-b^{(t-T)} - c^{(\sqrt{t} - \sqrt{T})})]$. Donde: “y” es la producción total de gas (ml), “t” es el tiempo de incubación (horas), *a* es la producción potencial de gas (ml), *b* describe la tasa fraccional de producción de gas (ml/h) y *c* es la tasa constante de producción de gas ($\text{h}^{-1/2}$), *T* representa el tiempo de retraso (horas) en que los microorganismos colonizan el sustrato para comenzar la fermentación.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas *in vitro* e *in sacco* fueron ajustados a un análisis de varianza mediante la utilización de un diseño completamente al azar.

$$Y_{ijk} = \mu + T_j + \varepsilon_{ijk}.$$

Donde: μ es la media general, T es el efecto debido al cereal y ε es error experimental.

En el análisis de varianza, se incluyó el cereal ($n = 4$) y su repetición (3 tandas de incubación). El análisis de varianza correspondiente se hizo mediante el procedimiento ANOVA del programa estadístico SAS (2002). Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1997).

Los datos obtenidos por el efecto de los tratamientos *in vivo* en las características de digestibilidad, flujos y dinámica ruminal fueron ajustados a un cuadro latino 2 X 2 replicado dos veces, y analizados utilizando el procedimiento PROC GLM de SAS (2002) (Versión 9.0, SAS Inst., Inc. Cary, NC):

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde, μ es la Media general, P_i es el efecto del periodo, A_j es el efecto del animal, T_k es el efecto debido al tratamiento y ε_{ijk} es el error aleatorio.

Los datos obtenidos entre técnicas (*in vivo*, *in vitro* e *in sacco*) fueron ajustados a un análisis de varianza mediante la utilización de un diseño completamente al azar.

$$Y_{ijk} = \mu + T_j + \varepsilon_{ijk}.$$

Donde: μ es la media general, T es el efecto debido al cereal y ε es error experimental.

En el análisis de varianza, se incluyó la técnica ($n = 3$) y su repetición (3 tandas de incubación). El análisis de varianza correspondiente se hizo mediante el procedimiento ANOVA del programa estadístico SAS (2002). Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1997).

Resultados

Composición química

La composición química se muestra en el Cuadro 1; los cereales utilizados muestran resultados muy similares con lo que respecta a MS, MO y N; sin embargo, la concentración de almidón fue mayor ($P < 0.01$) para sorgo y el contenido de FND fue mayor ($P < 0.05$) para el maíz.

Cuadro 1. Composición química de los cereales (g/kg MS).

Ítem	Maíz	Sorgo	EEM	Valor de P
MS	985.46	985.34	0.71	0.93
MO	981.58	980.74	0.30	0.21
N	15.71	15.71	0.04	1.00
Almidón	715.93 ^a	730.12 ^b	1.81	0.01
FND	126.10 ^a	117.46 ^b	0.20	0.01
EB, MJ/kg MS	20.39	18.03	0.25	0.01

Tamaño de partícula

Los datos de distribución del tamaño de partícula de las muestras individuales se presentan en el Cuadro 2. El tamaño de partícula mayor a 3.36 mm, como porcentaje del promedio de ambos cereales fue mayor para el maíz. El diámetro geométrico medio fue menor ($P < 0.01$) para el sorgo, indicando que el tamaño de partícula es más pequeño con respecto al maíz, por lo tanto, presenta más partículas por superficie de área y partículas por gramo.

Cuadro 2 Tamaño de partícula (mm) y características físicas del grano de maíz y sorgo

%	Maíz	Sorgo	EEM ²	P <
> 3.36	32.39 ^a	0.47 ^b	0.002	0.01
3.36 - 2.83	49.77 ^a	6.03 ^b	0.003	0.01
2.83 – 2.00	16.23	17.71	0.005	0.21
2.00 – 0.84	0.68 ^a	57.14 ^b	0.004	0.01
0.84 – 0.59	0.19 ^a	11.55 ^b	0.002	0.01
0.59 – 0.42	0.45 ^a	3.99 ^b	0.002	0.01
< 0.42	0.26 ^a	3.12 ^b	0.001	0.01
GMPS, µm	3026.00 ^a	1042.20 ^b	0.233	0.01
SA cm ² /g	20.22 ^a	77.23 ^b	0.778	0.01
Particle/g	39.2 ^a	2589.6 ^c	0.473	0.01
GSD	1.30 ^a	1.71 ^b	0.013	0.01

^{ab} Medias con diferente literal en la misma hilera son estadísticamente diferentes (P<0.01)

GMPS, Tamaño de partícula media geométrica; GSD, Desviación estándar geométrica; SA, Superficie de área.

²EEM = Error estándar de la media

Digestibilidad de la proteína

En el Cuadro 3 se presentan las digestibilidades por cereal y por técnica. Los cereales utilizados muestran digestibilidades similares con lo que respecta a MSd, PNDR y PDI; sin embargo, la PDR fue mayor (P<0.01) para sorgo. La comparación entre métodos de digestibilidad (*in vivo*, ruminal, digestibilidad enzimática y producción de gas), muestra que la MSd fue menor (P<0.01) para el método *in vivo*, mientras que para los métodos *in sacco* y producción de gas no se encontraron diferencias (P>0.05). La PDR fue mayor (P<0.01) para los métodos *in sacco* y enzimático (Daisy), por lo que la PNDR fue menor (P<0.01)

para los mismos métodos. La PDI fue menor ($P < 0.01$) para el método *in vivo* respecto a los métodos *in sacco* y enzimático.

Cuadro 3 Digestibilidad (g/100g MS) de la materia seca (MS), proteína degradable en rumen (PDR), proteína no degradable en rumen (PNDR), proteína digestible en intestino (PDI) del sorgo y maíz.

Item	Maíz	Sorgo	EEM	P<	<i>In vivo</i>	<i>In sacco</i>	<i>In vitro</i> (Daisy ^{II})	<i>In vitro</i> (Pgas)	EEM	P<
MSd	65.81	65.74	0.43	0.93	64.75 ^a	68.20 ^b	65.35 ^c	67.51 ^b	0.19	0.01
PC	9.80	9.80	0.15	0.21						
PDR	45.22 ^a	49.23 ^b	0.87	0.02	42.60 ^a	51.03 ^a	52.92 ^b	42.36 ^a	0.51	0.01
PNDR	51.31	50.76	1.02	0.78	57.40 ^a	48.96 ^b	47.07 ^b	57.64 ^b	0.82	0.01
PDI	60.49	58.61	1.05	0.37	61.37 ^a	65.70 ^b	65.40 ^b	--	0.36	0.01

^{abc} Letras diferentes en la misma son estadísticamente diferentes hilera $P < 0.05$

EEM = Error estandar de la media

Producción de gas

En el Cuadro 4 se presentan los parámetros de la producción de gas *in vitro* obtenidos del ajuste de la incubación (ml gas/g MS incubado) de los cereales utilizados en el presente estudio, donde se observa una ligera diferencia de la fracción A (ml gas/g MS incubado) siendo menor ($P > 0.01$) para el maíz, la velocidad con la cual los microorganismos del rumen fermentan los componentes del alimento o tasa de producción de gas (b) y la fracción c fue mayor ($P < 0.01$) para el maíz, para la fase de retardo o fracción lag el sorgo mostró un menor tiempo de retardo de la producción de gas ($P < 0.01$). Para la MSd (mg/100 mg) no se encontraron diferencias ($P < 0.93$) entre ambos cereales, mientras que la PGR (ml gas/g MS) fue mayor ($P < 0.01$) para sorgo.

Cuadro 4 Parametros de produccion de gas *in vitro* (ml gas/g MS) de granos de sorgo y maíz

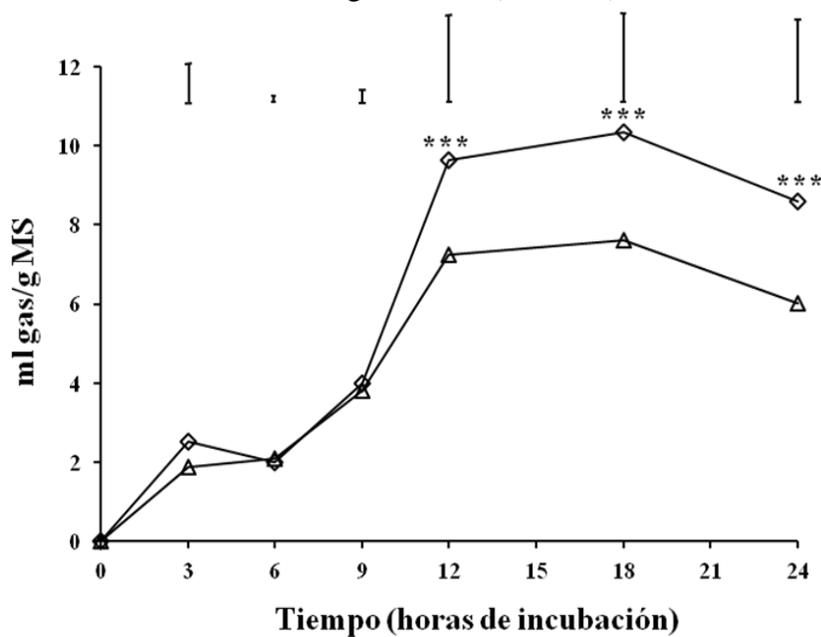
<i>Producción de gas in vitro</i>						
item	A	b	c	Lag time	MSd_{24h}	PGR
Maiz	89.02 ^d	0.021 ^d	0.037 ^d	1.20 ^d	65.81	135.26 ^d
Sorgo	94.94 ^e	0.018 ^e	0.031 ^e	0.74 ^e	65.74	144.41 ^e
EEM	0.16	0.22	0.55	0.04	0.43	0.51
Valor-P	0.01	0.01	0.01	0.01	0.93	0.01

A: Produccion total de gas (ml gas/g MS incubado), **b:** tasa de fermentacion (h^{-1}), **c:** tasa de fermentacion ($h^{-1/2}$), lag time (h), MSd_{24h}: MS desaparecida a las 24h (mg/100 mg), PGR: (ml gas 24h/g MSd_{24h}). EEM, error estandar de la media. ^{de} Diferentes letras entre hilareas son diferentes significativamente P<0.01.

Producción de gas por hora

Las curvas de producción de gas hasta las 24 horas (ml gas/ g MS) para las medias de los tratamientos utilizados se muestran en la Figura 1. La producción de gas no difiere entre granos (P=0.33) a las 3, 6 y 9 h, mientras que el sorgo muestra la mayor (P<0.01) producción de gas a las 12, 18 y 24 h.

Figura 1. Producción de gas a las 24 horas (ml gas/g MS) de Sorgo quebrado (◇) y Maíz quebrado (△), las barras muestran la desviación estándar que existe entre los granos utilizados, *** muestran diferencias significativa (P < 0.05).



Parámetros de fermentación ruminal *in vitro*

Los datos obtenidos al final de la fermentación se muestran en el Cuadro 5. Las muestras utilizadas (maíz y sorgo) fueron similares para pH, la producción de N-NH₃ fue mayor (P<0.01) para maíz, mientras que la producción total de AGV's al final de la fermentación (mol/100mol) de cada sustrato no presentó diferencias (P>0.05), entre los cereales evauados.

Cuadro 5. pH *In vitro* , N-NH₃, Acidos grasos volatiles (AGV) y concentracion de metano (mol/100mol) en granos de maiz y sorgo.

	Maiz	Sorgo	EEM	Valor-P
pH	7.0	7.0	0.17	0.13
N-NH ₃ (mg/dl)	11.0 ^a	9.7 ^b	0.26	0.01
AGV (mmol/100mol)				
Acético (A)	63.12	61.94	0.51	0.27
Propiónico (P)	27.04	28.46	0.34	0.08
Butírico	9.83	9.59	0.28	0.67
A/P	2.33	2.17	0.04	0.12
Metano	0.54	0.52	0.004	0.06

^{ab} diferentes letras entre hileras son diferentes estadísticamente P<0.01. EEM, error estandar de la media.

Discusión

Composición química y tamaño de partícula

El alimento que entra al rumen actúa como sustrato para la población microbiana. La disponibilidad de este sustrato para dicha población depende de la naturaleza del alimento por un lado y de la población microbiana por el otro. La naturaleza del alimento varía de acuerdo con su origen (variedad de grano), componente químico (carbohidratos estructurales y no estructurales carbohidratos, proteínas, lípidos). El molido o quebrado reduce el tamaño de partícula y aumenta la superficie de área a la degradación microbiana, pero también puede destruir las barreras físicas que existen alrededor de los componentes del alimento como son los gránulos de almidón (Yang et al., 2005). La MS para el maíz fue mayor a lo reportado por Álvarez et al. (2001), quienes citan un contenido de 850 g/kg MS

en maíz quebrado seco utilizado en dietas para vacas lecheras. El contenido de N no difiere a lo citado por Oba et al. (2003) quienes encuentran una concentración de 14.6 g N/kg MS, mientras que la concentración de almidón fue de 670 y 705 g/kg MS utilizando maíz con alta humedad y maíz quebrado siendo menores a lo encontrado en el presente estudio. Ramos et al. (2009) encuentran una concentración de almidón de 632 a 708 g/kg MS en diversos híbridos de maíz siendo menor a lo encontrado en el presente estudio. Existen pocos reportes en los efectos del tipo de molino (molinos de martillo o de rodillos) en los que no se observan diferencias significativas en las digestibilidades (*in vivo*) posiblemente por la fricción del calor. Se ha reportado el tiempo y el curso de la digestión enzimática del sorgo, pero hay más estudios sobre el sorgo molido con diferentes tamaños de partícula, pero se requieren, junto con descripciones matemáticas de los perfiles de digestión para explorar el significado de los parámetros de digestión y entender la cinética de digestión (Mahasukhonthacha et al. 2010).

Digestión de la proteína

El endospermo periférico que presenta el sorgo, es la principal barrera que deben atravesar las bacterias ruminales sobre todo cuando el grano no se haya procesado. Los métodos de procesado en seco, así como una alteración en el tamaño de partícula, altera las características físicas del grano, aumentando la superficie de área que es expuesta debido a que la matriz protéica es interrumpida y desnaturalizada, facilitando el acceso microbiano y enzimático a los componentes del grano, así mismo, el procesamiento de los granos aumenta la disponibilidad de los nutrientes en el rumen e intestino (Crocker et al. 1998; Richards et al. 2007). Ramos et al. (2009) encuentran una digestibilidad ruminal de la MS de 38.8 a 59.3 g/100 g MS utilizando varios híbridos de maíz (quebrado), siendo menores a los métodos de digestibilidad utilizados en el presente estudio, y una digestibilidad ruminal de 57 a 84 g PC/100 g MS siendo mayores ($P < 0.05$) a los métodos utilizados en el presente estudio. Zinn et al. (2008) muestran una digestibilidad ruminal de la proteína de 52 g/100 g MS y una digestión de la proteína a nivel intestinal de 65 g/100 g MS utilizando sorgo rolado seco en dietas de finalización para bovinos. Zinn et al. (2002) observan que los gránulos durante el procesamiento del grano, particularmente el endospermo corneo que es rico en proteína, expone más la proteína al proceso proteolítico posruminal. En el sorgo

existen varios tipos de proteínas que exhiben diferencias respecto a sus propiedades físicas, actividad biológica, y calidad nutricional. Así mismo, la disponibilidad del almidón se encuentra fuertemente influenciada por la solubilidad y fermentación de las proteínas. El tipo y cantidad de proteínas de almacenamiento en el grano determina su solubilidad (Van Barneveld, 1999). La eficiencia en la utilización podría maximizarse si el componente del alimento ofrecido a los rumiantes escapa de la fermentación ruminal y es digerido en el intestino delgado (Bird et al., 1999).

Producción de gas *in vitro*

Una estimación de la degradación puede hacerse por incubación de las muestras *in vitro* con líquido ruminal. La digestibilidad se deriva a partir de la desaparición de la MS (Tilley and Terry, 1963) o la cantidad de gas producido (Menke et al., 1979) después de un periodo de incubación fijo. Las curvas de producción de gas para las medias de maíz y sorgo se presentan en la figura 1. Las diferencias de producción de gas ocurren después de las primeras 9 h hasta las 24 h. Estas diferencias se atribuyen al contenido del endospermo corneo contenido en la matriz protéica del maíz y sorgo, ya que es resistente a la degradación, siendo mayor en el sorgo, por lo tanto, se esperaría que fuera menos digestible que el maíz (Streeter et al. 1993). Sin embargo, la producción de gas para el sorgo fue mayor ($P < 0.001$), las razones de una mayor producción de gas mayor no son claras; sin embargo, puede estar relacionado con el tamaño de partícula y la estructura del almidón; ya que estudios anteriores sobre la digestibilidad del almidón purificado en cultivos de sorgo mostraron que el almidón del sorgo resulto ser más digestible que el maíz (Hibberd et al. 1982; Kotarsky et al. 1992; Streeter et al. 1993), por su parte Hale (1973) indicó que la ruptura de la matriz protéica alrededor del almidón puede mejorar la digestión del grano procesado. Aproximadamente el 72 y el 73% del total de la MS es almidón (Cuadro 1) y la fermentación a partir de la proteína es relativamente poca, por lo que el almidón representa la mayor producción de gas (DePeters et al., 2003), por lo tanto, las tasas de digestión entre el maíz y el sorgo pueden ser parcialmente explicadas porque el contenido de almidón es mayor y es menos numeroso en el maíz que en el sorgo (Streeter et al., 1993). Una fermentación intensa, permitiría un crecimiento microbiano más rápido aumentando el consumo de alimento en los animales siempre que el pH no disminuya considerablemente (Ataşoğlu et al., 2006). La comparación de las tasas de digestión *in vitro* entre sorgo y maíz

pueden proveer información valiosa acerca del sitio y alcance de digestión. La producción de gas resulta de la fermentación de los carbohidratos solubles y estructurales del sustrato, mientras que la fermentación de proteínas y lípidos es escasa (Getachew et al., 1998).

Dinámica ruminal

La fuente de carbohidratos de la dieta influye en la proporción de AGV's producidos en el rumen. Desde el tipo de AGV's formados afecta la cantidad de gas producido. Los carbohidratos no fibrosos (almidón) promueven la producción de ácido propiónico ya que son fermentados más eficientemente; sin embargo, el consumo excesivo de carbohidratos altamente fermentables por los animales, ocurre cuando estos son adaptados primero a dietas altas en concentrados y/o cuando a los animales se les cambia de dieta, provocando una variación en el pH ruminal (Dijkstra et al., 2005; Owens et al., 1998). El pH obtenido por la fermentación de los cereales utilizados no muestra variación alguna, encontrándose dentro de los parámetros, el cual oscila de 6.2 a 7.0 (Calsamiglia et al., 2002). Álvarez et al. (2001), citan un pH de 6.0 en dietas para vacas lecheras con maíz quebrado seco menor a lo encontrado en el presente estudio. Los productos que se obtienen al final del proceso fermentativo, dependen en parte, de los microorganismos presentes en un momento dado en el rumen ya que los compuestos de algunas bacterias pueden ser utilizados por otros para su metabolismo (Weston et al., 1968). La producción de ácido acético y ácido butírico encontrado en el presente estudio no difieren a lo reportado por Corona et al. (2006), quienes citan una producción de ácido acético de 58 – 67 y de 10 - 11 mol/100 mol respectivamente; sin embargo, la producción de ácido propiónico mostro una tendencia ($P=0.08$) para los granos utilizados en el presente estudio con respecto al mismo autor quienes reportan una concentración de 24 a 26 mol/100 mol utilizando maíz rolado seco en dietas para ganado de engorda. El aumento de ácido propiónico se observa cuando la cantidad de concentrado adicionada es elevada y su composición es a base de granos con altas cantidades de almidón, por otra parte, la adición de concentrados disminuye la producción de metano (Blaxter et al. 1964). Este aumento puede deberse a que durante el tratamiento previo existe un grado de fragmentación parcial de los gránulos de almidón (Trei et al., 1966).

Conclusiones

Si bien existen procesos físicos y químicos de complejidad variable que pueden mejorar las características nutricionales de los granos (el sitio y alcance de digestión), la mayoría de las veces se recurre casi exclusivamente al molido o quebrado, por ser los más económicos, la digestión de la proteína del sorgo fue mayor a nivel intestinal, lo que representa un mejor aprovechamiento por el animal. La producción de gas aumenta por la reducción de tamaño de partícula. Las características antes mencionadas muestran que el sorgo puede ser utilizado como una alternativa al sustituir el maíz en las dietas para rumiantes.

Bibliografía

- Alvarez, J. H., Santini, J. F., Rearte, H. D., Elizalde, C. J. 2001. Milk production and ruminal digestion in lactating dairy cows grazing temperate pastures and supplement with dry cracked corn or high moisture corn. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 183 – 195
- Ankom Technology 2008 Procedures for fiber and *in vitro* analysis URL: http://www.ankom.com/09_procedures/Daisy%20method.pdf
- AOAC, 1991. Official methods of analysis. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA
- Ataşoğlu, C. Yurtman, Y. I. 2006. In vitro fermentation of different starches by mixed micro-organisms from the sheep rumen. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*. 91: 419 – 425
- Bird, H. S., Rowe, B.J., Choct, M., Stachiw, S., Tyler, P. Thompson, D. R. 1999. In vitro fermentation of grain and enzymatic digestion of cereal starch. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. 12: 53 – 61
- Blaxter, K. L., Wainman, W. F. 1964. Utilization of food by sheep and cattle. *Journal Agricultural Science*. 57:419 – 422
- Calsamiglia, S., Ferret, A. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y Meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA. Barcelona, 4 y 5 de Noviembre de 2002. pp. 97 - 115
- Calsamiglia, S., Stern, D. M. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal of Animal Science*. 73: 1459 – 1465
- Corona L., Rodriguez S., Ware R.A. and Zinn R.A. 2005. Comparative effect of whole, ground, dry-rolled and steam-flaked corn on digestion and performance in feedlot cattle. *The Professional Animal Science*. 21: 200-206
- Corona, L., Owens, N. F., Zinn, A. R. 2006. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. *J. Animal Science*. 84: 3020-3031
- Crocker, M. L., DePeters, J. E., Fadel, G. J., Perez-Monti, H., Taylor, J. S., Wyckoff, A. J., Zinn, A. R. 1998. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. *Journal of Dairy Science*. 81: 2394 - 2407
- Danesh Mesgaran, M., Stern, D. M. 2005. Ruminal and post-ruminal protein disappearance of various feeds originating from Iranian plant varieties determined by the in situ mobile bag technique and alternative methods. *Animal Feed Science and Technology*. 118: 31 - 46
- DePeters, J. E., Getachew, G., Fadel, G. J., Zinn, A. R., Taylor, J.S., Pareas, W. J., Hinders, G. R., Aseltine, S. M. 2003. In vitro gas production as a method to compare

- fermentation characteristics of steam-flaked corn. *Animal Feed Science and Technology*. 105: 109 – 122
- Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J., López, S. 2005. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 123 – 124: 561 - 578
- Ensor, H. H. 1970. A report: Committee on classification of particle size in feedstuffs. *Journal of Dairy Science*. 53: 689 - 670
- Faichney, G. J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: I. W. McDonald and A. C. I. Warner (Ed.). *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Univ. of New England Publ. Unit. Armidale, Australia
- France, J., Dhanoa, S. M., Theodorou, K. M., Lister, J. S. Davies, R. D., Isac, D. 1993. A model to interpreted gas accumulation profiles associates whit in vitro degradation of ruminants feeds. *Journal of Theoretical Biology*. 163: 99 – 11
- Gargallo, S., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2006. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, S. P. H., Becker, K. 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 261 - 281
- Goering, H. K. and P. I. Van Soest. 1970. Forage fiber analysts (*apparatus*, reagents, procedures, and some applications). *Agriculture Handbook 379*. ARS, ASDA. Washington, DC
- González Ronquillo, M., Fondevila, M., Barrios, U.A., Newman, Y. 1998. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris L.*) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilization and the season of growth. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 19-35
- Hale, W. H. 1973. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *Journal of Animal Science*. 37: 1075 – 1080
- Hibberd, C. A., Wagner, D. G., Schemm, R. L., Mitchel, E. D. Jr., Weibel, D. E., Hintz, R. L. 1982. Digestibility characteristics of isolated starch from sorghum and corn grain. *Journal of Animal Science*. 55: 1490 – 1497
- Hill, F. N., Anderson, D. L. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive determinations with growing chicks. *The Journal of Nutrition*. 64: 587-603
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Food Science*. 2: 131-144
- Kotarski, S. F., Waniska, R. D., Thurn, K. K. 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *Journal of Nutrition*. 122: 178 – 190

- Mahasukhonthacha, K., Sopade, A. P., Gidley, J. M. 2010. Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size. *Journal of Food Engineering* 96: 18–28
- Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K. 1999. Semi automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*. 79: 321–330
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science*. 93: 217 - 222
- National Research Council. 1996. Nutrient requirement of dairy cattle. 6th rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C
- Oba, M., Allen, S. M. 2003. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *Journal of Dairy Science*. 86: 184 – 194
- Olivera, P. M. R. 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para ruminantes con énfasis en las técnicas in sacco y la producción de gas in vitro. *Revista de Producción Animal*. 13: 45 – 51
- Ørskov, E. R., McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage *Journal of Agricultural Science Cambridge* 92: 499-503
- Owens, N. F., Secrist, S. D., Hill, J. W., Gill, R. D. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science*. 76: 275 - 286
- Pell, N. A., Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. 76: 1063 - 1073
- Ramos, O. M. B., Champion, M., Poncet, C., Mizubuti, Y. I., Nozière, P. 2009. Effects of vitreousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal *in sacco* degradation of dry matter, starch and nitrogen. *Animal Feed Science and Technology*. 148: 253 – 266
- Richards, J. C., Hicks, B. 2007. Processing of corn and sorghum for feedlot cattle. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*. 23: 207 – 221
- Siddons, R. C., Nolan, J. V., Beever, D., MacRae, J. C. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of nitrogen. *British Journal of Nutrition*. 54: 175-187
- Steel, R. G. D., Torrie, J. H. 1997. Principles and procedures of statistics. 39, McGraw Hill, New York
- Streeter, N. M., Hill, M. G., Wagner, G. D., Hibberd, A. C., Owens, N. f. 1993. Chemical and physical properties and in vitro dry matter and starch digestion of eight sorghum grain hybrids and maize. *Animal Feed Science and Technology*. 44: 45 – 58.
- System Analyses statistics (SAS) for windows. 2002

- Theodorou, K. M., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., France, J. A. 1994. simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185 – 197
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal British Grassland Society*. 18: 104-11
- Trei, J. E., Hale, J. W., Theurer, B. 1966. Influence of grain processing factors on in vitro fermentation rate. *Journal of Animal Science*. 25: 910 (Abstract)
- Van Barneveld, S. L. 1999. Chemical and physical characteristics of grains related to variability in energy and amino acid availability in ruminants: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50: 651 – 666
- Weatherburn, W. M. 1967. Phenol-Hypochloite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39: 971 – 975
- Weston, R. H., Hogan, P. J. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of rye grass and forage oats. *Australian Journal Agricultural Research*. 19: 419 – 432
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*. 43: 1452-1459
- Yang, J. H., Tamminga, S. Barbara, A. W., Dijkstra, J., Boer, H. 2005. In vitro gas and volatile fatty acids production profiles of barley and maize and their soluble and washout fractions after feed processing. *Animal Feed Science and Technology*. 120: 125 – 140
- Zinn, A. R., Alvarez, M., Montano, M., Salinas-Chavira, J. 2008. Influence of dry-rolling and tempering agent addition during the steam-flaking of sorghum grain on its feeding value for feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 86: 916 – 922
- Zinn, R. A., F. N. Owens, and R. A. Ware. 2002. Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 80:1145–1156

Office Outlook Web Access Escriba aquí para realizar la búsqueda: Esta carpeta

Correo Responder Responder a todos Reservar Mover Eliminar No marcado Leer

SJAR [3963] Submission Acknowledgement
Gemma Pérez Rivera [publinia@inia.es]

Ha reenviado este mensaje el 26/02/2013 11:21 a.m..

Enviado el: viernes, 11 de enero de 2013 02:21 p.m.
Para: Manuel Gonzalez Ronquillo

Dear MANUEL GONZALEZ-RONQUILLO:

Thank you for submitting the manuscript "In Vitro Gas Production and Ruminant Fermentation of Reconstituted and Ensiled Sorghum Grain" to Spanish Journal of Agricultural Research.

Manuscript URL:
<http://revistas.inia.es/index.php/sjar/author/submission/3963>
Username: ronquillo

If you have any questions, please contact with Gemma Perez (publinia@inia.es). Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Sincerely,

Spanish Journal of Agricultural Research
<http://revistas.inia.es/index.php/sjar>

Correo Calendario Contactos Borradores Correo no deseado Deleted Items (2) Inbox (5) Sent Items

Haga clic para ver todas las carpetas

Administrar carpetas...

In Vitro Gas Production and Ruminal Fermentation of Reconstituted and Ensiled Sorghum Grain

Ulises Alejandro González García¹, Luis Corona Gochi³, Julieta G. Estrada Flores², Manuel González Ronquillo^{1*}

¹*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario 100 Ote. Toluca. Mexico. 50000*

³*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Corresponding author. e-mail: mrg@uaemex.mx

Research Article : Short communication

Number of tables: 2

Topic Section : Animal Production

Running title: **In Vitro Gas Production in Reconstituted and Ensiled Sorghum Grain**

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of processing (dried or silage) sorghum grain, using the technique of *in vitro* gas production. Whole dried sorghum (WDS), dry cracked sorghum (DCS), whole silage sorghum (WSS) and cracked silage sorghum (CSS) were used. Data were analyzed using a completely randomized design and were compared the methods silage (S) vs. dry (D) and whole grain (W) vs. cracked grain (C). CP content was higher ($P < 0.001$) for WSS, while the starch content was higher ($P < 0.01$) for CSS. *In vitro* gas production was lower ($P > 0.01$) for WDS and DCS, DMd was higher ($P < 0.01$) for DCS and WDS. The results show that sorghum grain silage and either whole or broken decrease *in vitro* digestibility, acetic acid and methane production, compared with untreated sorghum.

Additional Key words: methane; silage; volatile fatty acids

Resumen

Producción de gas *in vitro* y fermentación ruminal de grano de sorgo reconstituido ensilado

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto en el grano de sorgo procesado (seco o ensilado), utilizando la técnica de producción de gas *in vitro*. Se utilizaron grano de sorgo entero seco (WDS), sorgo quebrado seco (DCS), ensilado de sorgo entero (WSS) y ensilado de sorgo quebrado (CSS). Los datos fueron analizados utilizando un diseño completamente al azar y se compararon los métodos de ensilado (S) vs seco (D), y grano entero (W) vs quebrado (C). El

contenido de proteína fue superior ($P < 0.001$) para WSS, mientras que el contenido de almidón fue superior ($P < 0.001$) para CSS. La producción de gas *in vitro* fue menor para WDS y DCS, la materia seca desaparecida fue superior ($P < 0.01$) para DCS y WDS. Los resultados muestran que el grano de sorgo ensilado ya sea entero o quebrado disminuye su digestibilidad *in vitro*, la concentración de ácido acético y la producción de metano, comparado con el sorgo seco.

Palabras clave adicionales: Ácidos grasos volátiles, ensilado, metano.

Abbreviations: CSS, cracked silage sorghum; DCS, dry cracked sorghum; DMd, dry matter disappeared; RGP, relative gas production; VFA's, volatile fatty acids; WDS, whole dried sorghum; WSS, whole silage sorghum;

Sorghum (*Sorghum bicolor L. Moench*) is a drought resistant crop and important source of food in semiarid regions worldwide. Often the characteristics used to define the quality of the protein of foods are its amino acid composition and digestibility of the protein (Baker *et al.*, 2010). However, starch is the main component in cereal grains and the largest source of energy, which is a major component of the diets for intensive production in ruminants (milk and meat). Despite small differences in total digestibility, the site of starch digestion may have an effect on the profile of substrates absorbed in the digestive tract of ruminants. Ruminal starch digestion provides volatile fatty acids (VFA's) for absorption and energy for microbial protein synthesis, and absorption in small intestine provides the absorption of glucose (Huhtanen & Sveinbjörnsson, 2006). Several methods have been adapted to improve the use of cereals in animal production, the reduction in particle size, the liquid feed, and silage reconstitution and thermal processing (pelleting, steam flaking and trapping). The technique of *in vitro* gas production has been used extensively over the last decades to study the degradation of food. The aim of this study was to evaluate the nutritional quality and effect of processing (whole or cracked) in grain sorghum silage or not, using the technique of *in vitro* gas production.

Sorghum samples were obtained from a commercial lot (Jilotepec, State of Mexico), which contained whole grains and negligible amounts of broken grains. For the development of this study, we used whole dried sorghum (WDS), whole silage sorghum (WSS), dry cracked sorghum (DCS) and cracked silage sorghum (CSS). Reconstitution of the grain was conducted by adding water to the entire grain to raise the humidity to 35%, for two samples, the first was ensiled in 42 days using WSS and 21 days using CSS. After the time of silage, 1000 g of samples were taken directly from the silos in triplicate and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis.

To determine the kinetics of ruminal degradation, the *in vitro* gas production technique was used according to the method described by Theodorou *et al.* (1994). Approximately 0.800 g DM of each ingredient was incubated in flasks with 90 ml of buffer solution and 10 ml of ruminal fluid having a replica of three flasks per sample. The rumen fluid was collected from three Holstein Dairy cattle (500 ± 10 kg BW). We collected an amount of 0.5 L of rumen fluid and 100 g of solid ruminal content from each cow before feeding the animals (0730 h) and filtering in a triple layer of gauze and glass wool, homogenized with CO₂ for five minutes and used as inoculums. Flasks were incubated in a water bath at 39 °C. The gas volume was recorded at 3, 6, 9, 12, 18 and 24 hours of incubation (Streeter *et al.*, 1993) using a pressure transducer, Delta (Model HD 8804). After the incubation period, we took a sample of contents of the flasks for further analysis and samples were filtered and dried (48 h, 65 °C) to determine the proportion of dry matter disappeared (DMd). Gas production at 24 h was correlated with DMd for gas production ratio (RGP: ml gas /g DMd).

Samples of feeds were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01) according to AOAC (1991). The neutral detergent fiber (aNDF-NDF, Van Soest *et al.*, 1991) analyses used an ANKOM200 Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, USA); aNDF-NDF was assayed with alpha amylase and sodium sulfite, expressed with residual ash. Starch content was determined by Zinn (1990). After the reading time of each period of incubation, the remaining liquid was filtered, taking 5 ml for determination of VFA by the method proposed by Jouany (1982) using 4-methyl valeric as internal marker and 10 ml of liquid to which were added 3.5 ml of HCl to obtain N-NH₃ (Weatherburn, 1967). Methane production was calculated according to the model described by Wolin (1960). Gas production was adjusted according to the model proposed by France *et al.* (1993) $y = A [1 - \exp(-b(t - T) - c(\sqrt{t} - \sqrt{T}))]$, where **y** is the total gas production (ml), **t** is the incubation time (hours), **A** is the potential gas production (ml), **b** describes the fractional rate of gas production (ml / h), **c** is the constant rate of gas production (h^{-1/2}), and **T** represents the delay time (hours) in which microorganisms colonize the substrate to start the fermentation.

The data obtained between techniques were adjusted to an analysis of variance using a completely randomized design, the ANOVA procedure of SAS statistical software (1999): $Y_{ijk} = \mu + T_j + \varepsilon_{ijk}$, where μ is the overall mean, T_j is the effect due to the grain and ε is the experimental error. In the analysis of variance, included were the treatment (n = 4) and their replication (3 rounds of incubation). A comparison of preservation methods (dry and silage) and the particle size (whole and cracked) was performed; the averages were compared by Tukey test.

The chemical composition shown in Table 1, the DM was higher ($P < 0.001$) for dried compared with silages grains, but no differences ($P=0.13$) were found for OM; N content was higher ($P < 0.001$) for WSS compared with the rest of the treatments, while the starch was higher ($P < 0.001$) for CSS. When compared by treatment (silage vs. dry) DM was higher in the dry treatments compared with silages. For OM content were no differences between treatments ($P=0.43$), sorghum silage showed the highest starch content ($P < 0.01$) compared to dry sorghum. Various methods of processing grain have been developed to increase its digestibility and energy value: grinding, dry rolled and steam, high grain harvest moisture content and reconstitution, which adds enough moisture to dry grain to adapt fermentation of 25% or greater for proper reconstitution (Richards & Hicks, 2007). The results obtained in this study do not differ from Richards & Hicks (2007), who found that increasing the grain protein after ensiling indicates that the protein matrix around the starch remains unfolded by the step of storing the grain; likewise Richards & Hicks (2007) mentions that nitrogen is highly correlated with the level of humidity and increases with storage time. Cabral *et al.* (2005) reported a protein concentration of 109 g/kg DM being similar to WSS. The reduction in particle size and reconstitution promote a favorable response due to the weakening in the sub cell organization of the peripheral endosperm that can increase the availability of starch (Streeter *et al.*, 1993). The highest starch content in CSS could be because the silage procedure makes the starch more available than the rest of the treatments.

Table 1 shows the parameters of *in vitro* gas production obtained from the adjustment of incubation (ml gas/g DM incubated), which shows that the fraction A (ml gas/g incubated DM) was lower ($P < 0.01$) for WSS compared with the rest of the treatments, being higher in CSS. Fraction b was lower ($P < 0.01$) for CSS and WDS compared to other treatments. The fraction c was higher ($P < 0.01$) for WSS followed by DCS; however, lag time was higher for WDS ($P < 0.01$) compared to the rest. The DMd was higher ($P < 0.01$) for WDS and DCS and lower for WSS and CSS. The RGP (ml gas/g DMd) was higher ($P < 0.01$) for CSS with respect to other treatments. Silages have higher total gas production ($P < 0.01$); with respect to the dry sorghums, there were not differences for lag time ($P=0.65$). DMd was higher ($P < 0.01$) for dried vs. silage grains; the lag time fraction was higher ($P < 0.01$) in the whole grains compared to the cracked grains. DMd was higher for dry grains ($P < 0.01$) compared with the silage, while the RGP was greater ($P < 0.01$) for silage treatment compared to dry grains.

Differences in gas production between treatments may be due to the alteration in the starch molecules, due to the method used for grain processing, allowing easy access of the ruminal bacteria's to the grain nutrients, in these conditions would be expected that the analysis of the

kinetics of gas production from the fermentation provide quick information predominant fraction, so that a variation in curves can be attributed to fermentation the fermentation of starch. (Table 1) (Lanzas *et al.*, 2007). The values obtained for the fraction b, were no different to that reported by Lanzas *et al.* (2007) in sorghum and barley, while lag time in sorghum grain was lower than DCS and CSS in the present study. Cabral *et al.* (2005) found a lag phase at 24 hours of incubation in sorghum treated with polyethylene glycol higher than those found in the present study, while the DMd was lower. Souza *et al.* (2003) found an apparent DMd of 60 mg/100 mg of DM by *in vitro* and *in situ* methods, several sorghum silages with high and low concentrations of tannins, being lower than those reported in the present study; this is due to different concentration of condensed tannins contained in the grain. The RGP was higher ($P<0.01$) for CSS compared to other treatments; gas production is mainly produced by fermentation of carbohydrates to VFA production, as the fermentation of proteins in lower measure (Getachew *et al.*, 1998). The discrepancy between studies may be attributed to the different methods used and the proportion of inoculums, buffer solution, the effects of processing and the mathematical model used to evaluate the gas production data (Lanzas *et al.*, 2007). Moreover, the information regarding the *in vitro* digestion as well as production rates of gas to the cereal grains are scarce (Lanzas *et al.*, 2007).

N-NH₃ production (mg/dl) was higher ($P<0.01$) for WSS compared to other treatments; DCS presented the lowest concentration. The concentration of acetic acid was lower for CSS ($P<0.01$), while the highest concentration was for DCS. Propionic acid was higher ($P<0.01$) for WSS and CSS, and butyric acid concentration was lower ($P<0.01$) for WDS and WSS. Acetic acid concentration was lower for silages grains ($P<0.01$); propionic acid was higher ($P<0.01$) for sorghum silage. Butyric acid was lower ($P>0.01$) for WSS from the rest, and propionic acid show a trend ($P=0.06$) being higher for silages compared with dry grains. The acetic:propionic acid ratio was higher ($P<0.01$) for DCS, while methane production was lower ($P<0.01$) for sorghum silage. When compared by treatment, dried sorghum had the highest concentration of acetic acid, methane and higher acetic:propionic relationship with respect to the silages. Propionic and butyric acid was higher ($P<0.01$) for the cracked grain compared with whole grain, while methane production was lower ($P<0.01$). N content in the treatments was digested during the fermentation, resulting in increased production of N-NH₃ for WSS (Table 2). Oliveira *et al.* (2007) found a concentration of N-NH₃ of 8.5 and 9.3 in sorghum containing low and high tannin supplemented with urea, still lower than that found in the present study. Oliveira *et al.* (2007) states that lower levels of N-NH₃ to 13 mg/dL may affect the N availability to microorganisms. The ruminal VFA production is important for quantitative and qualitative reasons. In ruminants, VFA represents the largest source of energy absorbed. Also, the type and profile of VFA formed determines the partition of nutrients

in the animal. The acetic acid concentration found in the present study does not differ from studies by Corona *et al.* (2006), who found a concentration of acetic acid from 57 to 62 mol/100 mol in different corn hybrids using dry rolling as a treatment, but they are smaller than those reported by Abdelhadi & Santini, (2006) who found a concentration of 63 mmol / mol using grain sorghum silage in cattle grazing. The reconstitution of sorghum had positive effects on the production of propionic acid; silage had higher ($P < 0.01$) concentration compared to the dry treatment. Corona *et al.* (2005) reported a concentration of 28 mol/100 mol using corn-steam flaking being smaller than those reported in the present study. It is well known that the fermentation of starch by the bacteria produce a high production of propionic acid (35 to 45 mol/100 mol VFA); likewise, conventional reconstitution improves feed efficiency of livestock 10 to 15 % compared to the dry cracked grain (Ørskov, 1986). Corona *et al.* (2006) reported a ratio of acetic:propionic acid of 2.98 mol/100 mol in beef cattle diets based on dry rolled corn, greater than WSS and CSS, while corn-steam flaking diets finds values of 1.51 mol/100 mol lower than those found in the present study. Abdelhadi & Santini (2006) founded a ratio of 3.4 in acetic:propionic in beef cattle supplemented with grain sorghum silage, being higher than DCS. Methane production for silage treatments was lower compared to the dry grains. Carmona *et al.* (2005) mentioned that diets rich in starch improve the production of propionic acid by decreasing the ratio methane/organic matter fermented in the rumen, and it can be considered as a competitive form of H_2 ions in the rumen; this is common in systems where high amounts of concentrate are supplied in the diets. Likewise, it is mentioned that high concentrations of acetate and butyrate promote the production of methane.

Reconstitution of sorghum grain silage and either whole or cracked decrease *in vitro* digestibility, acetic acid and methane production, compared with untreated sorghum. Data demonstrated that sorghum grain silage improve rumen starch availability, increasing propionic acid and reducing the methane production.

Acknowledgment

Mr. González García was granted for a CONACyT fellowship during his PhD. studies in the University Autonomous State of Mexico. We also thank Miss. Liz Hooper, LTC- University of North Texas for the critical review of the present manuscript.

References

- Abdelhadi OL, Santini JF, 2006. Corn silage *versus* sorghum silage as a supplement to growing steers grazing high quality pastures: Effects on performance and ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol* 127: 33 – 24.
- AOAC, 1991. Official methods of analysis. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Baker ABAA, El Tinay HA, Yagoub AEA, 2010. Protein content and digestibility of sorghum (*Sorghum bicolor*) based fermented gruel: effect of supplementation with soybean protein. *Agric Food Chem* 9: 1494 – 1501.
- Cabral LS, Valadares Filho SC, Detmann E, Zervoudakis T, Pereira OG, Veloso RG, 2005. Composição químico-bromatológica, produção de gás, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e NDT estimado da silagem de sorgo com diferentes proporções de panículas. *Rev Bras Zootecn* 32: 1250–1258.
- Carmona CJ, Bolívar MD, Giraldo AL, 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental. *Rev Colomb Cienc Pecu* 18: 49 – 63.
- Corona L, Rodriguez S, Ware AR, Zinn AR, 2005. Comparative effects of whole, grown, dry-roller, and steam flaked corn on digestion and growth performance in feedlot cattle. *Prof Anim Sci* 21: 200 – 206.
- Corona L, Owens NF, Zinn AR, 2006. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. *J Anim Sci* 84: 3020 – 3031.
- France J, Dhanoa SM, Theodorou KM, Lister JS, Davies R.D, Isac D, 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associates with *in vitro* degradation of ruminants feeds. *J Theor Biol* 163: 99 – 11.
- Getachew G, Blümmel M, Makkar SPH, Becker K, 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 72: 261–281.
- Huhtanen P, Sveinbjörnsson J, 2006. Evaluation of methods for estimating starch digestibility and digestion kinetics in ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 130: 95 -113.
- Jouany JP, 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermented contents. *Food Sci* 2: 131-144.
- Lanzas C, Fox GD, Pell NA, 2007. Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim Feed Sci Technol* 136: 265 – 280.
- Ørskov RE, 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *J Anim Sci* 63: 1624 – 1633.
- Oliveira G S, Berchielli T T, Pedreira DSM, Primavesi O, Frighetto R, Lima AM, 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim Feed Sci Technol* 135: 236 – 248.
- Richards JC, Hicks B, 2007. Processing of corn and sorghum for feedlot cattle. *Vet Clin Food Anim Pract* 23: 207 – 221.
- SAS, (1999). SAS System for Windows. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

- Souza VG, Pereira OG, Moraes SA, Valadares Filho RGSC, Zago CP, Freitas EVV, 2003. Valor nutritivo da silagem de sorgo. *Rev Bras Zootecn* 32: 753–759.
- Streeter NM, Hill MG, Wagner GD, Hibberd AC, Owens FN, 1993. Chemical and physical properties and in vitro dry matter and starch digestion of eight sorghum grain hybrids and maize. *Anim Feed Sci Technol* 44: 45 – 58.
- Theodorou KM, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France JA, 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Anim Feed Sci Technol* 48: 185 – 197.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583-3597.
- Zinn RA, 1990. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. *J Anim Sci* 68: 767-775.
- Weatherburn WM, 1967. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39: 971 – 975.
- Wolin MJ, 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J Dairy Sci* 43: 1452-1459.

Table 1. Chemical composition (g/kg DM) and *in vitro* gas production (ml gas/g DM) parameters of sorghum grains.

<i>Item</i>	DM	OM	CP	Starch	<i>In vitro Gas production</i>				
					A	b	c	Lag time	DMd
WDS	977 ^d	985	102 ^e	744 ^{fg}	106 ^g	0.015 ^f	-0.022 ^e	1.69 ^d	77 ^f
DCS	992 ^d	986	98 ^e	742 ^{ef}	95 ^d	0.018 ^e	-0.031 ^f	0.74 ^e	80 ^f
WSS	658 ^e	978	111 ^d	752 ^e	89 ^e	0.021 ^d	-0.038 ^d	1.42 ^d	68 ^d
CSS	646 ^e	977	98 ^e	758 ^d	111 ^f	0.015 ^f	-0.023 ^e	0.74 ^e	61 ^d
SEM	0.28	0.02	1.05	0.23	0.23	0.002	0.002	0.07	0.40
<i>P-value</i>									
<i>T_x</i>	0.01	0.13	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>D vs S</i>	0.01	0.43	0.07	0.01	0.01	0.38	0.28	0.65	0.01
<i>W vs C</i>	0.97	0.43	0.01	0.01	0.01	0.34	0.49	0.01	0.04

WDS: Whole Dried Sorghum, DCS: Dry Cracked Sorghum, WSS: Whole Silage Sorghum, CSS: Cracked Silage Sorghum. D: Dry grain sorghum, S: Silage grain sorghum, W: whole grain sorghum, C: cracked grain sorghum, A: total gas production (ml gas/g DM incubated), b: fermentation rate (h^{-1}), c: fermentation rate ($\text{h}^{-1/2}$), lag time (h), DMd_{24h}: DMd disappeared at 24h (mg/100 mg), SEM: standard error of the mean. ^{defg} Means within column with different superscript differ ($P < 0.05$).

Table 2. *In vitro* N-NH₃, volatile fatty acids (VFA) and methane concentration (mol/100mol) from sorghum grains.

	Dry grain		Silage grain		SEM	<i>P</i> -value		
	WDS	DCS	WSS	SCS		<i>T</i> _x	<i>D</i> vs <i>S</i>	<i>W</i> vs <i>C</i>
N-NH ₃ (mg/dl)	11.0 ^{bc}	9.7 ^d	12.3 ^a	10.0 ^{cd}	0.21	0.01	0.06	0.44
VFA (mmol/100mol)								
Acetic (A)	58.8 ^b	61.9 ^a	54.9 ^{bc}	53.3 ^c	0.42	0.01	0.01	0.05
Propionic (P)	33.5 ^b	28.5 ^a	36.8 ^c	36.4 ^c	0.23	0.01	0.06	0.01
Butyric	7.7 ^c	9.6 ^{abc}	8.2 ^{bc}	10.3 ^a	0.32	0.01	0.88	0.01
A/P	1.5 ^c	2.2 ^a	1.8 ^b	1.9 ^b	0.04	0.01	0.03	0.01
Methane (mmol/100mol)	0.5 ^c	0.5 ^a	0.4 ^b	0.4 ^b	0.05	0.01	0.02	0.01

SCS: Silage Cracked Sorghum, **WDS:** Whole Dried Sorghum, **WSS:** Whole Silage Sorghum, **DCS:** Dry Cracked Sorghum. **D:** Dry grain sorghum, **S:** Silage grain sorghum, **W:** whole grain sorghum, **C:** cracked grain sorghum SEM, standard error mean. ^{abcd} Means within row with different superscript differ ($P < 0.05$).

COMPARACION DE TECNICAS IN VIVO, IN VITRO E IN SACCO EN LA DETERMINACION DE LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL E INTESTINAL DEL GRANO DE SORGO RECONSTITUIDO Y ENSILADO.

González García UA¹, Corona GL³, Estrada Flores JG², AZM. Salem¹ and González Ronquillo M^{1*}

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México,

² Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México DF.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo comparar las técnicas *in situ*, *in vitro* (Daisy y producción de gas) e *in vivo* para estimar la cinética de degradación del grano de sorgo. Para el desarrollo del presente estudio se utilizó sorgo entero seco (SES), sorgo entero ensilado (SEE), sorgo quebrado seco (SQS), sorgo quebrado ensilado (SQE). Se determinó la degradación de la MS y PC mediante las técnicas *in vivo*, *in sacco* e *in vitro* (Daisy) y producción de gas, a nivel ruminal e intestinal. Para la degradación *in vivo* se utilizaron 4 bovinos fistulados en rumen y duodeno, y mediante las pruebas *in sacco* (24h) e *in vitro* Daisy (24) y producción de gas *in vitro* (24h) para determinar la degradación ruminal. Los residuos obtenidos de la digestión *in vitro* (Daisy) e *in situ* fueron sometidos a una digestión intestinal (pepsina-pancreatina). La materia orgánica fue similar (981.32 ± 0.52) en todos los tratamientos, mientras que para el N, el SEE mostró la mayor concentración, SQE mostró la mayor cantidad de almidón respecto al resto de los tratamientos. La materia seca desaparecida (MSd) y la proteína degradada en rumen (PDR) fue mayor para los sorgos enteros respecto a los quebrados, mientras que la proteína degradada en intestino (PDi) fue mayor para los ensilados con respecto a los granos secos. La degradación de la MS fue mayor utilizando la técnica *in sacco* con respecto a los otros métodos, mientras que para la PDR y la PDi los métodos *in sacco* e *in vitro* (Daisy) mostraron una mejor degradabilidad con respecto al *in vivo*.

Palabras clave: Sorgo, Digestibilidad, Degradabilidad, *in vitro*,

INTRODUCCIÓN

La energía y la proteína constituyen los nutrientes básicos de los ingredientes utilizados en la producción intensiva de rumiantes, cuyas fuentes principales son los cereales y los concentrados proteicos de origen vegetal o animal. En los últimos años, los cereales han sido utilizados en la industria ganadera, y para poder ser aprovechados por los rumiantes, han sido sometidos a varios métodos de procesamiento como son: hojueado al vapor, reconstitución, cosechado temprano con alta humedad (ensilado), reventado, micronizado, mientras que el no procesado se refiere al grano entero, quebrado, molido y rolado seco (**Theurer, 1986; Guada, 1993**). Estudios relacionados con los efectos del procesamiento en la alteración del almidón y la proteína de los cereales y su utilización se pueden clasificar en tres categorías: 1) rendimiento y eficiencia en el aprovechamiento del alimento; 2) las mediciones *in vitro* en los cambios estructurales del almidón, los índices de fermentación microbiana ruminal o degradación enzimática y 3) en las determinaciones ruminal, posruminal y total *in vivo* (**DePeters et al., 2003**). Debido a que, en los estudios *in vivo* los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales, actualmente existen numerosos análisis de laboratorio para estimar la digestión ruminal e intestinal de la proteína (**Calsamiglia et al. 1995; Gargallo et al. 2006**) utilizando varios procedimientos enzimáticos los cuales son simples y de costo razonable comparado con los métodos *in vivo* (**Danesh Mesgaran et al. 2005**). La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (**Theodorou et al., 1994**). Una ventaja de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (**Pell et al., 1997**). El método *in sacco*, tiene como objetivo fundamental proporcionar estimativas de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes de los alimentos sometidos al efecto del ambiente ruminal (**Olivera, 2001**). El sistema Daisy^{II} (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU) se utiliza como método alternativo para calcular la degradación *in vitro* del alimento en el rumen e intestino en condiciones de laboratorio. Por otra parte; la tasa de digestión de los nutrientes de un alimento varía inversamente con el tamaño de partícula, este efecto es más

evidente en granos de baja degradabilidad ruminal como el sorgo y el maíz, ya que en función del tipo de procesamiento y de la dieta acompañante, puede modificarse el sitio de digestión de los granos (**Ramos et al. 2009; Al-Rabadi et al. 2011**). El objetivo del presente estudio fue estimar la composición química, la producción de gas *in vitro* y la cinética de degradación de la proteína al evaluar diferentes técnicas, utilizando sorgo con diferentes tipos de procesamiento.

MATERIAL Y METODOS

Grano de sorgo y tratamientos

Las muestras de sorgo fueron obtenidas de un lote comercial, el cual contenía los granos enteros y cantidades insignificantes de granos partidos. Para el desarrollo del presente estudio se utilizó sorgo entero seco (**SES**), sorgo entero ensilado (**SEE**), sorgo quebrado seco (**SQS**), sorgo quebrado ensilado (**SQE**), las cuales fueron molidas en un molino Willey a 3 mm Ø (Arthur H. Thomas Philadelphia, PA) para las incubaciones *in vitro* e *in situ* y de 1 mm para la producción de gas. La reconstitución del grano se realizó mediante la adición de agua a todo el grano, para elevar la humedad a 35%, para ello se utilizaron dos muestras, la primera se ensiló a 42 días utilizando grano entero (**SEE**) y 21 días utilizando sorgo quebrado (**SQE**) (**Huck, 1999; Simpson, 1985**). Ambas muestras fueron ensiladas en botes de polietileno con una capacidad de 200L y almacenadas a temperatura ambiente (25 a 27° C) en un cuarto oscuro, para después ser abiertos en el tiempo antes mencionado. Pasado el tiempo de ensilado se extrajo una cantidad de 1000 g de muestra de la parte del centro de cada macrosilo, colocándolo en bolsas de polietileno, y se almacenaron a -20° C para análisis posteriores.

Tamaño de partícula

Para la determinación de tamaño de partícula, se utilizó un agitador W.S TYLER 8570 (Mod. RX-812) con cribas del número 6 (3.360 mm), 7 (2.830 mm), 10 (2.000 mm), 20 (0.840 mm), 30 (0.590 mm), 40 (0.420 mm), con un tiempo de agitación de 10 minutos por cada tratamiento (**Ensor, 1970**).

Evaluación *in vivo*

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) canulados en rumen, los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos, SES, SEE, SQS y SQE. Los animales fueron alimentados a las 0800 y 2000 h al 2 % PV, con acceso libre al agua de bebida. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d para adaptación a las dietas y 5 d para la recolección de muestras. Las dietas se utilizaron (Cuadro 1) con un 73% de inclusión en MS de cada uno de los tratamientos y el resto (% MS) fue a base de melaza de caña (5%), urea (1%), sales minerales (0.05%), heno de avena (12%) y alfalfa (6%), para cubrir sus necesidades de mantenimiento (NRC, 1996). Se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) al 0.40% de inclusión en el suplemento como marcador de flujo (Corona et al., 2005). Se tomaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 ml/ hora de muestreo), por cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350h, el día 17 a las 0900 y 1500h, el día 18 a las 1050 y 1650h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Evaluación *in situ*

Se utilizaron tres bovinos de raza holstein (PV 300 ± 50 Kg) con cánula ruminal permanente para determinar la digestibilidad de la MS y la proteína (PC) de acuerdo a la técnica descrita por Ørskov y McDonald (1979). Los animales fueron alimentados *ad libitum* (0800 y 1600 h), con una dieta que contenía 60% heno de cebada y 40% concentrado a base de sorgo y soya (15% PC, 12.56 MJ EM/ kg MS). Se pesaron 5 g MS de muestra y fueron colocados en bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 µm), para posteriormente ser sometidas a 24h de incubación ruminal por triplicado, posteriormente fueron lavados manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60 °C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad ruminal *in vitro*

Las muestras de grano fueron incubadas *in vitro*, para la cual se preparó un medio de cultivo de acuerdo a la metodología descrita por Daisy^{II} (Ankom Technology – 11/00), que consta de dos soluciones buffer: solución A: KH₂PO₄ (10 g/l), MgSO₄•7H₂O (0.5 g/l), NaCl (0.5 g/l), CaCl₂•2H₂O (1 g/l), Urea (grado reactivo; 0.5g/l); solución B: NaCO₃ (15 g/l) y

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1g/l). El medio de cultivo se realizo en una proporción de 4:1 (medio de cultivo: líquido ruminal) a una temperatura de 39 °C, agitando la solución para permitir una mezcla uniforme. El líquido ruminal se obtuvo de los bovinos fistulados mencionados anteriormente. Se utilizaron 45 bolsas de nylon (Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μm) depositando en cada una de ellas 5 g MS de muestra. Los granos fueron incubados por 24 h, depositando 5 bolsas por jarra, realizándose tres repeticiones. Pasado el tiempo las bolsas fueron lavadas con agua de la llave hasta que el agua escurrió limpia, para después ser secadas en estufa de aire forzado a 60° C por 72 horas para análisis posteriores.

Digestibilidad intestinal *in vitro*

Los residuos obtenidos de la digestión *in vitro* (Daisy^{II}) e *in situ* fueron sometidos a una digestión intestinal (pepsina-pancreatina), de acuerdo al método descrito por **Gargallo et al. (2006)**. En cada una de las jarras de digestión se incubaron al azar ocho replicas (bolsas Ankom R510, 5 X 10 cm, con tamaño de poro de 50 μm) por tratamiento (10 bolsas/jarra con 1 g MS de muestra), incluyendo un blanco, con el fin de generar el factor de corrección, se introdujeron dentro de cada jarra que contenía una solución de 2 L de HCl al 0.1 N ajustada a un pH de 1.9 con 1 g/L de pepsina (P-700), permaneciendo por un tiempo de 1 h a una rotación constante a 39° C. Pasado ese tiempo, las bolsas fueron lavadas manualmente con agua corriente hasta que escurrió limpia, posteriormente fueron depositadas dentro de los botes de incubación (10 bolsas por bote) los cuales contenían 2 L de una solución de pancreatina (con una solución buffer de KH_2PO_4 al 0.5M ajustada a un pH de 7.75) conteniendo 50 ppm de timol y 3 g/L de pancreatina (P-7545, Sigma), y permanecieron a una rotación circular constante a 39°C durante 24 h. Posteriormente se lavaron con agua corriente hasta que escurrió limpia y secados en estufa de aire forzado a 60° C por 72 horas para análisis posteriores.

Producción de gas *in vitro*

Para determinar la cinética de degradación ruminal se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo al método descrito por **Theodorou et al. (1994)** y **Mauricio et al. (1999)**. Aproximadamente 0.800 g MS de cada ingrediente fueron incubados en botellas de vidrio con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal teniendo una réplica de tres botellas por muestra. Se tomaron muestras de líquido ruminal (0.5 L) y sólido (100 g en

fresco) de los bovinos mencionados anteriormente, previo a la alimentación (0730 h) de los animales, extraído y filtrado en triple capa de gasa y lana de vidrio, se homogenizó con CO₂ durante cinco minutos, posteriormente fueron mezclados y utilizados como inóculo. Las botellas fueron incubadas en un baño de agua a 39°C. El volumen de gas fue registrado a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas de incubación por medio de un transductor de presión marca Delta (Modelo HD 8804). Después del periodo de incubación, se tomó una muestra de contenido de los frascos para posteriores análisis y las muestras fueron filtradas y secadas (48 h, 65 °C) para medir la proporción de materia seca desaparecida (MSd). La producción de gas a las 24 h se correlacionó con la materia seca desaparecida para obtener la producción de gas relativa (PGR: ml gas g⁻¹ MSd) (**Gonzalez Ronquillo et al., 1998**).

Análisis de laboratorio

A las muestras iniciales se determinó el contenido de materia seca (MS) en una estufa de aire forzado (60° C, 48 h), posteriormente se molieron (molino Wiley, 1 mm Ø) para determinar Cenizas (600° C por 3 h), y su diferencia para Materia Orgánica, así como el contenido de aNDF-NDF (**Goering y Van Soest, 1970**) utilizando alfa amilasa (ANKOM FAA), se determinó el N utilizando el método Kjeldahl (**AOAC, 1991**) y la proteína cruda (PC) fue calculada como N X 6.25. Para la determinación de energía bruta (**EB**) se utilizó una bomba calorimétrica adiabática PARR[®] (Gallenkamp, Automatic Adiabatic Bomb). La digestión del marcador (**Cr**) se realizó mediante la técnica descrita por **Hill y Anderson (1958)**, posteriormente la concentración del marcador (Cr₂O₃) en duodeno y heces se determinó por espectrofotometría de absorción atómica, después de la solubilización de las muestras incineradas (**Siddons et al., 1985**). Los residuos obtenidos de las muestras utilizadas en las pruebas de incubación ruminal y pepsina-pancreática, así como los residuos de producción de gas fueron analizados para MS (60° C, 48 h, en una estufa de aire forzado) y N (método Kjeldahl; AOAC, 1991). La PDi no fue determinada en los residuos de producción de gas debido a que no fue suficiente.

Finalizado el tiempo de lectura de cada periodo de incubación de la **Producción de gas *in vitro***, se registró la lectura de pH (Conductronic pH130) a cada frasco, posteriormente se

filtro el líquido y se tomaron 5 ml para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV'S) por el método propuesto por Jouany (1982) utilizando el 4- metil valerico como marcador interno, y 10 ml a los cuales se les adiciono 3.5 ml de HCl para la obtención de NNH_3 (Weatherburn, 1967). La producción de metano se calculo de acuerdo al modelo descrito por Wolin (1960).

Cálculos

Para el cálculo de tamaño de partícula se utilizo la siguiente fórmula

$$d_{gw} = \log^{-1} \frac{\sum(W_i \log d_i)}{\sum W}$$

$$S_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum W_i (\log d_i - \log d_{gw})^2}{\sum W} \right]^{1/2}$$

Donde: d_i = Diámetro de la abertura de la malla de i^{th} criba, d_{i+1} = Diámetro del tamaño de la próxima criba que i^{th} es la criba (justo sobre el grupo), d_{gw} = Diámetro de la media geométrica, d_i = Diámetro geométrico de la partícula en i^{th} criba., i^{th} criba = $[d_i \times d_{i+1}]^{1/2}$, S_{gw} = Desviación estándar geométrica.

Digestibilidad in vivo

La digestión del N fue calculada mediante la siguiente fórmula (Faichney, 1975):

Digestibilidad ruminal del nutriente =

$$100 - 100 \left[\frac{(\% \text{ marcador en el alimento} / \% \text{ marcador en duodeno}) \times (\% \text{ de nutriente en duodeno} / \% \text{ de nutriente en alimento})}{1} \right]$$

Digestibilidad in vivo, in vitro (Daisy^{II}) e in sacco

La materia seca desaparecida fue calculada mediante la siguiente fórmula:

Digestibilidad del nutriente =

$$\left[\frac{(\text{Consumo del nutriente} - \text{nutriente en heces})}{\text{consumo del nutriente}} \right] \times 100$$

Digestibilidad intestinal

In vitro

La digestión pepsina-pancreatina del N fue calculada como el N en la muestra original menos el nitrógeno restante después de la incubación pepsina-pancreatina dividido por el N de la muestra original (Gargallo et al., 2006).

In vivo

La digestión intestinal del N fue calculada mediante la siguiente fórmula:

Digestibilidad del nutriente =

$$\left[\frac{\text{(g/nutriente que entra al intestino - nutriente en heces)}}{\text{g/nutriente que entra al intestino}} \right] \times 100$$

Producción de gas *in vitro*

La producción de gas se estimó en ml/gas por hora, así mismo fue ajustada de acuerdo al modelo propuesto por France *et al.* (1993) $y = a [1 - \exp(-b^{(t-T)} - c^{(\sqrt{t}-\sqrt{T})})]$. Donde: “y” es la producción total de gas (ml), “t” es el tiempo de incubación (horas), *a* es la producción potencial de gas (ml), *b* describe la tasa fraccional de producción de gas (ml/h) y *c* es la tasa constante de producción de gas ($\text{h}^{-1/2}$), *T* representa el tiempo de retraso (horas) en que los microorganismos colonizan el sustrato para comenzar la fermentación.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas *In vitro e in sacco* fueron ajustados a un análisis de varianza mediante la utilización de un diseño completamente al azar.

$$Y_{ijk} = \mu + T_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ es la media general, *T* es el efecto debido al cereal y ε es error experimental.

En análisis de varianza, se incluyó el cereal (*n* = 4) y su repetición (3 tandas de incubación). El análisis de varianza correspondiente se hizo mediante el procedimiento ANOVA del

programa estadístico SAS (1999). Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1997).

Los datos obtenidos por el efecto de los tratamientos *In vivo* en las características de digestibilidad, flujos y dinámica ruminal fueron ajustados a un cuadro latino 4 X 4 y analizados utilizando el procedimiento PROC GLM de SAS (2002) (Versión 9.0, SAS Inst., Inc., Cary, NC):

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + E_{ijk}$$

Donde, μ es la Media general, P_i es el efecto del periodo, A_j es el efecto del animal, T_k es el efecto debido al tratamiento y e_{ijk} es el error aleatorio.

Los datos obtenidos entre técnicas (*In vivo, in vitro e in sacco*) fueron ajustados a un análisis de varianza mediante la utilización de un diseño completamente al azar.

$$Y_{ijk} = \mu + T_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ es la media general, T es el efecto debido al cereal y ε es error experimental.

En el análisis de varianza, se incluyó la técnica (n = 3) y su repetición (3 tandas de incubación). El análisis de varianza correspondiente se hizo mediante el procedimiento ANOVA del programa estadístico SAS (2002). Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1997). El efecto de los tratamientos quebrado vs entero y seco vs ensilado se realizó por medio de contrastes ortogonales.

Resultados y discusión

Composición química

El contenido de MS en los ensilados fue menor ($P < 0.01$) respecto al resto de los granos utilizados; así mismo, presentaron un contenido de MO similar entre ellos, por lo que no se encontraron diferencias significativas ($P=0.155$), el contenido de N fue mayor ($P<0.001$) para SEE respecto al resto de los tratamientos, la reconstitución y ensilaje del grano aumento la disponibilidad de almidón en SQE y SEE, el contenido de FND fue diferente ($P<0.001$) entre los cereales, siendo SQS el que muestra el menor contenido. El contenido de energía bruta fue mayor ($P<0.001$) para los ensilados con respecto a los granos secos. En adición a la alteración del tamaño de partícula, se modifica la estructura química del grano

ya que la matriz proteica es interrumpida y desnaturalizada lo suficiente para el acceso microbiano y enzimático (Crocker et al. 1998). El contenido de MS en el presente estudio fue menor para los granos ensilados ($P < 0.05$) respecto a lo citado por Rodríguez et al. (2005) y Abdelhadi et al. (2006), quienes reportan un contenido de MS en promedio de 881 g/kg MS utilizando grano de sorgo seco y 402 g/kg utilizando grano de sorgo ensilado. El contenido de MO para SES y SQS no difiere a lo obtenido por Lanzas et al. (2007) quienes reportan un contenido de 983 g/kg MS utilizando diferentes variedades de sorgo. El contenido de N en el presente estudio fue superior para SES y SEE en comparación a lo reportado por Baker et al. (2010) y Abdelhadi et al. (2006) quienes encuentran un contenido de N de 16.6 g/kg MS para sorgo cocinado y 10.72 g/kg MS utilizando grano de sorgo ensilado respectivamente, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio son menores a lo citado por Hamid et al. (2007) utilizando grano de maíz con 18.8 g/kg MS. El contenido de almidón, fue mayor para SQE con comparación a lo encontrado por DePeters et al. (2003) y Lanzas et al. (2007) quienes reportan un contenido de almidón de 741 g/kg MS en el maíz hojueado al vapor y 696 g/kg MS en 23 diferentes variedades de sorgo, respectivamente. Finalmente, el contenido de FND para SQE no difiere a lo reportado por Lanzas et al. (2007) al obtener un contenido de FND de 78 g/kg MS; sin embargo; el resto de los tratamientos fue superior.

Cuadro 1. Composición química de los cereales (g/kg MS).

item	Tratamientos					<i>P value</i>		
	SQE	SES	SEE	SQS	EEM	Tx	S vs En	E vs Q
MS	646.4 ^a	976.9 ^b	658.8 ^a	985.34 ^b	1.65	0.001	0.001	0.654
MO	981.5 ^a	981.5 ^a	981.5 ^a	980.8 ^a	0.14	0.155	0.536	0.631
N	15.7 ^a	16.2 ^a	17.7 ^b	15.7 ^a	0.08	0.001	0.001	0.001
Almidón	783.7 ^a	720.9 ^c	735.7 ^b	730.1 ^{bc}	1.43	0.001	0.001	0.001

FND	70.9 ^b	92.2 ^a	95.00 ^a	65.0 ^c	0.57	0.001	0.026	0.001
GE, MJ/kg MS	20.39 ^a	18.03 ^b	19.57 ^a	18.03 ^b	0.21	0.001	0.001	0.510

SQE: Sorgo quebrado ensilado; **SES:** Sorgo entero seco; **SEE:** Sorgo entero ensilado; **SQS:** Sorgo quebrado seco. ^{abcd} diferentes literales en la misma línea P<0.05

Tamaño de partícula

El efecto del procesamiento de los tratamientos utilizados y las características físicas se muestran en el **Cuadro 2**. El tamaño de partícula mayor a 3.36 mm fue superior ($P < 0.001$) para SES seguido por SEE, siendo menor para SQE y SQS, sin embargo cuando se tamiza entre 2.8 y 3.36 mm, se observa que el mayor porcentaje fue para los SES y SEE ($65 \pm 0.4\%$) y el menor porcentaje fue para el SQE y SQS ($6 \pm 0.4\%$), cuando se analiza el tamaño de partícula de 0.8 a 2.0 mm, se observa que los sorgos quebrados (SQS y SQE) mostraron el mayor porcentaje ($P < 0.001$) ($56 \pm 0.4\%$), con respecto al resto. El valor del diámetro geométrico medio de los granos procesados fue menor ($P < 0.001$) para los sorgos quebrados ($1028.3 \pm 13.9 \mu\text{m}$), siendo superiores el SES y SEE (3250 ± 0.4). El número de partículas fue mayor ($P < 0.001$) para el SQE, seguido del SQS, con respecto a los demás tratamientos. La superficie de área (cm^2/g) fue mayor ($P < 0.001$) para SQE y SQS (78 ± 0.4), y la menor superficie la presentan SES y SEE (17 ± 0.4). Los datos del tamaño de partícula de las muestras individuales se muestran en el **Cuadro 2**. Aunque los granos quebrados no son comúnmente utilizados en la industria alimenticia, el interés potencial de esta práctica para controlar el proceso digestivo ha sido bien documentada, por lo que en un futuro, el desarrollo de esta práctica no pueden ser excluida, en especial cuando el concentrado es producido dentro del mismo sistema de producción (**Ramos et al. 2009**). Los diferentes tratamientos produjeron diferencias entre los tamaños de partícula con una desviación estándar geométrica mayor ($P < 0.0001$) para los sorgos quebrados (1.72 en promedio) siendo menores a **Al – Rabadi et al. (2011)** con una desviación estándar geométrica de 1.96; el tamaño de partícula mayor a 3.36 mm como porcentaje del total promedio fue desde 0.47 (RCS) a 33.60 (DWS), y mayor a 0.42 mm fue desde 0.00 (DWS y SWS) a 4.33 (SCS). El diámetro geométrico medio para el procesado del grano suele ser menor para los granos quebrados con respecto a los enteros. El tamaño de partícula así

como la superficie de área fue mayor para los sorgos quebrados con respecto al resto de los tratamientos. Existen diferentes formas en que el tamaño de partícula que puede afectar la velocidad y alcance de penetración del agua ya que la estructura física del grano juega un papel importante, particularmente en la fracción bruta; en la cual la penetración de agua es más lenta (Al – Rabadi et al. 2011). El tamaño de partícula en el caso de granos que van a ser ensilados, permite una mejor compactación, mayor superficie de ataque para los microorganismos del ensilaje, por lo tanto se logra un silo de mejor calidad; de esta forma una mayor digestión ruminal actuaría favoreciendo la proteína microbiana que llegue a intestino delgado. El conocimiento actual permite seleccionar el tipo de grano a emplear en función de los requerimientos de los animales y del tipo de dieta acompañante. Pero no debe realizarse un picado o quebrado excesivo porque si bien se mejora la calidad del ensilaje a nivel de laboratorio, el aprovechamiento por parte del animal podría ser menor (Theurer, 1986; Fonseca et al. 2000; Ramos et al. 2009).

Table 2 Particle size (mm) and physics characteristics as a function of grain processing method.

%	Tratamientos					P <
	SQE	SEE	SES	SQS	SEM	
> 3.36	0.85 ^b	33.36 ^a	29.46 ^a	0.67 ^b	0.09	0.001
3.36 - 2.83	6.15 ^b	64.23 ^a	67.86 ^a	5.78 ^b	0.06	0.001
2.83 – 2.00	17.25 ^a	1.84 ^b	1.85 ^b	17.71 ^a	0.02	0.001
2.00 – 0.84	56.05 ^a	0.57 ^b	0.68 ^b	57.66 ^a	0.04	0.001
0.84 – 0.59	11.86 ^a	0.02 ^a	0.01 ^a	11.71 ^a	0.03	0.001
0.59 – 0.42	3.59 ^a	0.09 ^a	0.36 ^a	3.20 ^b	0.01	0.001
< 0.42	4.27 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a	3.18 ^a	0.04	0.001
GMPS, μm	1032.00 ^b	3222.40 ^a	3196.20 ^a	1046.80 ^b	1.49	0.001
GSD	1.73 ^a	1.14 ^b	1.15 ^b	1.71 ^a	0.01	0.001
Particle/g	2953.41 ^a	25.60 ^b	26.30 ^b	2537.80 ^b	5.95	0.001

SA cm ² /g	79.64 ^a	16.64 ^b	16.86 ^b	76.71 ^a	0.57	0.001
-----------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	------	-------

^{abc} Means with different literals within the same row are different (P<0.0001).

¹Reconstituted Cracked Sorghum (**RCS**), Dried Whole Sorghum (**DWS**), Reconstituted Whole Sorghum (**RWS**), Dry Cracked Sorghum (**SQS**). GMPS, Geometric mean particle size; GSD, Geometric Standard Deviation; SA, Surface area. ^{abcd} diferentes literales en la misma línea. ²SEM = Standard Error Mean

Digestibilidad de la proteína

Los granos de cereales están embebidos por una matriz proteica dentro del endospermo, la cual varía en cantidad y solubilidad de la proteína dentro del mismo impidiendo la disponibilidad de los nutrientes, y se requiere de su ruptura para que sea liberado y digerido por los microorganismos ruminales. Por otro lado, la digestión de los nutrientes también se ve afectada por otros factores como son, el tipo de grano, método de procesamiento o de conservación y tipo de endospermo (Oba et al. 2003). En el Cuadro 3 se muestran las digestibilidades por tratamiento y por técnica. De acuerdo al tratamiento la MSd y PDR fue mayor (P = 0.001) para los granos enteros respecto a los quebrados, la proteína no degradable en rumen (PNDR) por el contrario fue menor (P = 0.001) para sorgos enteros con respecto a los quebrados, la PDi fue mayor en SQE (P = 0.012, 11.96%) seguido de SEE (P = 0.012, 9.83%) con respecto a SQS y SES. La digestibilidad de la MS fue mayor a lo reportado por **Abdelhadi et al. (2006)** y **Lema et al. (2000)**, quienes citan una digestibilidad de 51.5 g/100 g MS utilizando sorgo ensilado, y de 58 g/100 g MS utilizando diferentes variedades de sorgo ensilado, sin embargo la digestibilidad de la MS para SEE fue menor con respecto a lo reportado por **Mabjeesh et al. (2000)** quienes citan una digestibilidad de la MS de 77.2 g/100 g MS evaluando varios tipos de alimento utilizados en la industria ganadera entre ellos el sorgo. Cuando se contrastan por tratamiento, la MSd, la PDR y PDi fue mayor (P=0.001) para los secos respecto a los ensilados, mientras que la PNDR fue mayor (P = 0.001) fue mayor para los ensilados. Cuando se contrastan por tratamientos, los sorgos quebrados muestran una mayor (P = 0.038) MSd, no encontrando diferencias en la PDR para ambos tratamientos, la PNDR y la PDi fue mayor (P = 0.001) para los sorgos enteros respecto a los quebrados. La comparación de las diferentes técnicas utilizadas para determinar la digestión en el grano de sorgo, la técnica in sacco tuvo una

mejor digestibilidad de la MS ($P = 0.001$, 2.96%) respecto al resto de las técnicas. La digestión de la PDR fue mayor ($P=0.001$, 4.44%) para los métodos *in vitro* (Daisy) e *in sacco* con respecto a la técnica *in vivo* y producción de gas *in vitro*, por el contrario la PNDR fue mayor ($P=0.001$) para los métodos *in vitro* de producción de gas e *in vivo*, la PDi fue menor ($P=0.001$, 3.90%) para el método *in vivo* con respecto al *in sacco* e *in vitro* Daisy. Cuando se contrastan por tratamiento, la MSd, la PDR y PDi fue mayor ($P=0.001$) para los secos respecto a los ensilados, mientras que la PNDR fue mayor ($P = 0.001$) fue mayor para los ensilados. Cuando se contrastan por método de procesamiento, la MSd mayor ($P = 0.040$) fue para los quebrados, mientras que para la PDR no se encontraron diferencias ($P = 0.972$), la PNDR y la PDi fue mayor ($P = 0.006$) para los sorgos enteros respecto a los quebrados. **Ortega et al. (1998)** encuentran una digestibilidad ruminal (*in sacco*) de la PC de 32.94 g/ 100 g de MS en sorgo tratado con formaldehído siendo menor a lo encontrado en el presente estudio, **Zinn et al. (2008)**, encuentran una digestibilidad ruminal de la PC 49 a 52.3 g/kg MS utilizando sorgo hojueado al vapor en dietas para bovinos de engorda siendo mayor la digestión a lo encontrado en el presente estudio, así mismo, encuentran una digestión intestinal de la proteína que llega al intestino de 72 a 74 g/kg MS siendo menor a la digestibilidad presentada por SQE. **Baker et al. (2010)** encuentran una digestibilidad de la proteína de 21.82 g/kg MS en sorgo sin tratar a un tiempo de fermentación de 16 h, esto se debe a que el proceso de fermentación aumenta la digestibilidad de la proteína debido a la presencia de enzimas endógenas (**Correia et al. 2010**). La digestión de la PC fue mayor ($P<0.001$) SES y SEE con lo reportado por **Baker et al. (2010)** quienes muestran una digestibilidad de la proteína de 37.02 g/kg MS en sorgo cocinado utilizando una digestión enzimática y de 37.12 g/kg MS en sorgo cocinado, así mismo **Coreira et al. (2011)** utilizando una digestión enzimática, encuentran una disminución en la digestión de la proteína utilizando alta presión en el grano de sorgo antes de ser cocinado. Para la MSd *in sacco* los valores obtenidos en el presente estudio fueron superiores a lo reportado por **Molina et al. (2000)** quienes muestran una digestibilidad de la MS de 60.23 g/100g MS a las 24 de incubación con sorgos bajos en taninos, mientras que **Ramos et al. (2009)** encuentran una digestibilidad de la MS de 44.3 g/100 g MS incubada, utilizando maíz quebrado, **Ortega et al. (1998)** muestran una digestibilidad de la MS de 53.90, 54.80 g/kg MS utilizando sorgo rociado y remojado con formaldehído utilizando una

incubación de 24 h con el método *in sacco*. La digestibilidad de la MS fue menor ($P < 0.019$) en el presente estudio a lo reportado por **Mabjeesh et al. (2000)** quienes encuentran una digestibilidad del 77.2 g/kg MS utilizando el método tradicional Daisy^{II} en el cual se evaluaron diferentes alimentos utilizados en la industria ganadera entre ellos el sorgo. **Defoor et al. (2000)** citan una digestibilidad de la materia seca de 50.62 g/kg MS utilizando una digestión enzimática *in vitro* para evaluar el valor nutritivo en diferentes variedades de sorgo, siendo menores a lo reportado en el presente estudio. Por otra parte **Lema et al. (2000)** citan una digestibilidad de la MS *in vitro* (producción de gas) del 57.8 g/kg MS utilizando diferentes variedades de sorgo. La digestibilidad de la MS *in vivo* en el presente estudio fue superior a lo encontrado por **Bárcena et al. (2002)** quienes citan una digestión de 45, 46 y 56 g/100g MS utilizando dietas para corderos con sorgo tratado con α -amilasa y glucoamilasa. Los valores obtenidos para la PDR son mayores a lo reportado por **Ortega et al. (1998)** quienes utilizando el método *in sacco* encuentran una digestión de la PC de 32.94 g/100g MS en sorgo tratado con formaldehído para evitar la degradación de la proteína a nivel ruminal. La digestibilidad de la proteína no difiere a lo reportado por **Duodu et al. (2002)** quienes citan una digestibilidad de la proteína del 65 y 67 g/100g MS en sorgo no tratado, sin embargo; los mismos autores reportan una digestibilidad de la proteína de 49 y 44 g/100g MS en sorgo cocinado, siendo menores esos resultados a los obtenidos en el presente estudio. Los resultados obtenidos para los granos ensilados son mayores a lo citado por **Coreira et al. (2011)** quienes encontraron una disminución en la digestión de la proteína de 42 a 35 g/100gMS utilizando una digestión *in vitro* con pepsina en tratamientos con alta presión en el grano de sorgo antes del cocinado para disminuir los efectos que reducen la digestión de la proteína en el grano.

Cuadro 3. Digestibilidad (g/100g MS) de la materia seca (MS), proteína degradable en rumen (PDR), proteína no degradable en rumen (PNDR), proteína digestible en intestino (PDi).

Tratamiento	MSd	PDR	PNDR	PDi
SQS	65.74 ^a	42.49 ^a	57.50 ^a	45.56 ^c
SES	68.02 ^b	46.58 ^b	53.42 ^b	48.42 ^b
SEE	67.73 ^b	46.55 ^b	53.44 ^b	51.59 ^a
SQE	65.05 ^a	43.87 ^a	56.12 ^a	52.59 ^a
EEM	0.23	0.21	0.46	0.24
P value	0.001	0.001	0.001	0.012
S vs En	0.001	0.001	0.001	0.001
E vs Q	0.038	0.857	0.014	0.001
Tecnica				
<i>In vivo</i>	65.35 ^a	44.23 ^a	55.77 ^a	64.97 ^a
<i>In sacco</i>	69.11 ^b	46.20 ^b	53.79 ^b	67.52 ^b
<i>In vitro</i> (Daisy)	66.82 ^{ac}	45.50 ^b	54.49 ^{ab}	67.49 ^b
<i>In vitro</i> (Pgas)	66.26 ^{ac}	43.57 ^c	56.42 ^a	-----
EEM	0.25	0.27	0.39	0.54
P – Value	0.022	0.003	0.001	0.001
S vs En	0.001	0.001	0.001	0.001
E vs Q	0.040	0.972	0.012	0.001

SQE: Sorgo quebrado ensilado; **SES:** Sorgo entero seco; **SEE:** Sorgo entero ensilado; **SQS:** Sorgo quebrado seco, Tx: tratamiento, Tec: técnica, S: grano de sorgo seco, En: grano de sorgo ensilado, E: grano de sorgo entero, Q: grano de sorgo quebrado, MSd: materia seca desaparecida. **PDR:** Proteína degradable en rumen; **PNDR:** proteína no degradable en rumen; **PDi:** proteína degradable en intestino. ^{abcd}Medias con diferentes literales dentro de la misma fila son diferentes (P<0.01).

Producción de gas *in vitro* y características de fermentación

En el **Cuadro 4** se presentan los parámetros de la producción de gas *in vitro* obtenidos del ajuste de la incubación (ml gas/g MS incubado) de los diferentes tratamientos utilizados en el presente estudio, donde se observa que la fracción A fue menor ($P<0.001$) para SEE, y la mayor producción de gas fue para el SES. La fracción b fue menor ($P>0.01$) para SQE y SES, seguido de SEE, siendo superior SQS. La fracción c fue mayor ($P<0.01$) para SEE seguido de SQS con respecto al resto, sin embargo; para lag time, SES y SEE fue superior ($P<0.01$) con respecto a SQE y SQS. La PGR (ml gas/g MSd) fue mayor ($P<0.01$) para SQE, seguido por $SES > SQS > SEE$. Cuando se contrastan por tratamiento, la fracción A fue mayor ($P=0.001$) para los granos secos con respecto a los ensilados, mientras que para la fracción b, c y lag time no se encontraron diferencias, la MSd fue mayor ($P=0.001$) para los secos, mientras que la PGR fue mayor ($P=0.001$) para los ensilados. Con respecto al método de procesamiento, la fracción A fue mayor ($P=0.001$) para los granos enteros respecto a los quebrados, mientras que para la fracción b, c y lag time no se encontraron diferencias, la MSd fue mayor ($P=0.001$) para los granos enteros. La fermentación del grano determina en gran medida el valor alimenticio de los granos para consumo de los rumiantes. Esto afecta el sitio de digestión del almidón (ya que la mayor parte se degrada después de las 6 primeras h de incubación y se termina a las 24 h) y el suplemento de proteína microbiana, teniendo un efecto importante en el ambiente ruminal desde su relación con el pH, la producción de ácidos grasos volátiles (AGV'S) y la actividad celulolítica (**Lanzas et al 2007; Chai et al. 2004**). El aumento de la fermentación y degradabilidad del sorgo reconstituido y ensilado puede ser atribuido a la combinación de la actividad de las enzimas endógenas en el grano durante la fase aeróbica y a las enzimas exógenas de microorganismos orgánicos durante la fase anaeróbica (**Balogun et al. 2005**). La digestibilidad de la MS a las 24 h fue mayor para SQE y SEE (79 y 77% respectivamente) respecto al resto de los cereales, siendo mayor a lo encontrado por **Rodríguez (2005)** quien reporta una digestibilidad *in vitro* de la MS del 66% evaluando diferentes genotipos de sorgos forrajeros con un promedio total del 57%, esta diferencia se podría deber a un efecto del proceso de ensilado sobre la disponibilidad de los constituyentes del grano frente a la degradación ruminal (**Owens et al., 2005**), sin embargo difieren de lo reportado por **Ortega et al. (1998)** quienes reportan una digestión *in vitro* de

la MS del 87% utilizando sorgo tratado con formaldehído. La baja digestibilidad de la MS se debe a que en la ración existen fuentes de carbohidratos rápidamente fermentables (**Mertens et al. 1980**), lo cual puede lograrse con métodos de procesamiento aplicados al grano y así promover modificaciones en su calidad nutricional (**Correia et al. 2010**).

Cuadro 4. Producción de gas *in vitro* (ml gas/g MS) de granos de sorgo entero ensilado (SES) y quebrado (SQE) y sin ensilar, utilizados mediante el modelo propuesto por France et al. (1993).

Ítem	Producción de gas <i>in vitro</i>				P - Value		
	SES	SQS	SEE	SQE	Tx	S vs En	E vs Q
A	106 ^g	95 ^d	89 ^e	111 ^f	0.001	0.001	0.001
b	0.015 ^f	0.018 ^e	0.021 ^d	0.015 ^f	0.001	0.387	0.341
c	-0.022 ^e	-0.031 ^f	-0.038 ^d	-0.023 ^e	0.001	0.283	0.499
Lag time	1.69 ^d	0.74 ^e	1.42 ^d	0.74 ^e	0.001	0.650	0.001
MSd	68.02 ^d	65.74 ^e	67.73 ^d	65.05 ^e	0.001	0.001	0.043

SQE: Sorgo quebrado ensilado; **SES:** Sorgo entero seco; **SEE:** Sorgo entero ensilado; **SQS:** Sorgo quebrado seco. Tx: tratamientos, S: grano de sorgo seco, En: grano de sorgo ensilado, E: grano de sorgo entero, Q: grano de sorgo quebrado, A: producción total de gas (ml gas/g MS desaparecida), b: índice de fermentación (h^{-1}), c: índice de fermentación ($h^{-1/2}$), tiempo lag (h), PGR: (ml gas 24h/g DMd_{24h}).^{defg} diferentes literales en la misma línea.

Con lo que respecta a la concentración de pH *in vitro* (**Cuadro 5**) no se encontraron diferencias (P=0.225) entre tratamientos. Los resultados para pH obtenidos en el presente estudio difieren con **Azkar et al. (2006)** quienes citan un pH de 4.95 a 5.60, en corderos alimentados con dietas a base de grano entero de cebada suplementados proteico. Por otra parte, **Corona et al. (2005)** citan un pH de 6 -6.65 con 4 dietas para bovinos que contenían 75% de maíz con diferentes métodos de procesamiento (hojueleado al vapor, entero, rolado seco y molido), **Galyean et al. (1979)** reporta que el pH no se ve afectado por el tamaño de partícula; así mismo, **Bach et al. (2005)** reportan que la digestibilidad de las proteínas es

menor con la disminución del pH. La producción de N-NH₃, (mg/dl) fue menor (P=0.001) para los sorgos secos respecto a los ensilados. La concentración de N-NH₃ para SEE, no difiere (122 mg/L) a lo encontrado por **Azkar et al. (2011)** quienes citan una concentración de 121 mg/L utilizando una dieta a base de grano de cebada entero con un suplemento de proteína y bicarbonato de sodio. Las proporciones de AGV`S (mmol/100mol) de las incubaciones in vitro, muestra que los granos secos quebrados presentan la mayor producción de ácido acético con respecto a los ensilados, el ácido propiónico fue mayor (P<0.001) para los granos ensilados, mientras que SEE presenta la menor (P=0.001) producción de ácido butírico con respecto al resto. La relación acético:propiónico fue mayor (P=0.001) para SQS, y menor para SEE. Con lo que respecta a la producción de metano, el SQE y SEE muestran una menor producción (P=0.001) seguido de SES, siendo superior el SQS. Cuando se contrasta por tratamiento, la mayor producción de N-NH₃ (mg/dl) ácido propiónico la presentan los granos ensilados respecto a los secos, mientras que la mayor (P=0.01) producción de ácido acético fue para los granos secos, no encontrando diferencia para el ácido butírico, la relación acético:propiónico y la producción de metano fue mayor para los sorgos secos respecto a los sorgos ensilados. Cuando se contrasta por método de procesamiento, el ácido acético, ácido butírico, la relación acético:propiónico y la producción de metano es mayor en los sorgos quebrados respecto a los enteros, mientras que los enteros presentan la mayor (P=0.001) cantidad de ácido propiónico, no encontrando diferencias para pH y N-NH₃. **Koenig et al. (2003)** citan una concentración de ácido acético de 58 mol/100mol utilizando una inclusión del 20% de grano de cebada rolada al vapor en dietas para corderos, siendo superiores a los obtenidos en el presente estudio para los granos ensilados. Los resultados obtenidos para los sorgos ensilados difieren a lo encontrado por **Azkar et al. (2006)** Quienes reportan una concentración de ácido propiónico (40 mol/100 mol) en dietas a base de grano de cebada entero con un suplemento de proteína a libre acceso para corderos en crecimiento; sin embargo; son similares a lo reportado por el mismo **Azkar et al. (2011)** y **Zinn et al. (2008)** quienes encuentran una concentración de ácido propiónico de 36 mol/100 mol utilizando las mismas dietas con bicarbonato de sodio y de 35 a 37 mol/100mol en sorgo hojueleado al vapor adicionando un agente de temperatura durante el hojueleado, respectivamente. La concentración de ácido butírico no difiere a lo reportado por **Corona**

et al. (2006) quienes citan una concentración de de 8.4 a 11 mol/100mol utilizando maíz hojueleado al vapor en dietas para bovinos de engorda, así mismo, encuentran una relación de acético/propiónico de **2.24 a 2.98 mol/100mol** siendo superiores a lo encontrado en el presente estudio. **Miller et al. (2008)** encuentran una concentración de ácido butírico 9.4 mol/100mol en dietas para ovejas con alto contenido de sorgo tratado con enzimas exógenas menores a lo encontrado en el presente estudio, la relación de acético propiónico (2.7 mol/100mol) reportada por el mismo autor fue superior con respecto a los sorgos ensilados.

Cuadro 5. Influencia del grano procesado sobre pH, producción de N-NH₃ y concentración de AGV (mmol/100mol) y metano (mmol/100mol).

item	Ensilado		Seco		EEM	P - Value		
	SQE	SEE	SES	SQS		Tx	S vs En	E vs Q
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	0.01	0.225	0.703	0.596
N-NH ₃ , (mg/dl)	11.03 ^b	12.26 ^a	9.98 ^c	9.73 ^c	0.21	0.001	0.062	0.446
AGV (mol/100 mol)								
Acético	53.30 ^a	54.94 ^a	58.78 ^b	61.94 ^c	0.44	0.001	0.001	0.051
Propiónico	36.39 ^a	36.82 ^a	32.82 ^b	28.46 ^c	0.24	0.001	0.065	0.001
Butírico	10.30 ^a	7.72 ^b	8.23 ^{ab}	9.59 ^{ab}	0.22	0.018	0.883	0.001
A/P	1.86 ^a	1.53 ^b	1.79 ^c	2.17 ^d	0.02	0.001	0.037	0.001
Metano	0.41 ^a	0.45 ^b	0.47 ^b	0.52 ^c	0.03	0.001	0.023	0.001

SQE: Sorgo quebrado ensilado; **SEE:** Sorgo entero ensilado **SES:** Sorgo entero seco; **SQS:** Sorgo quebrado seco, **Tx:** tratamiento, **S:** grano de sorgo seco, **En:** grano de sorgo ensilado, **E:** grano de sorgo entero, **Q:** grano de sorgo quebrado. ^{abcd} diferentes literales en la misma línea

Conclusiones

El procesado adecuado de los granos aumenta la digestibilidad de los nutrientes que entran al tracto digestivo de los rumiantes, así mismo, los estudios *in vitro* indican que la digestión de la materia seca por los microorganismos ruminales puede ser más eficiente si el grano ha sido procesado adecuadamente. En nuestro estudio los granos de sorgo reconstituidos tuvieron una respuesta favorable en la disponibilidad de los nutrientes, comparado con los granos secos. La mayor producción de ácido propiónico *in vitro*, puede ser producida por unidad de materia seca digerida por los microorganismos ruminales cuando el grano procesado se compara con el no procesado.

Bibliografía

- Abdelhadi, O.L., Santini, J.F., 2006. Corn silage *versus* sorghum silage as a supplement to growing steers grazing high quality pastures: Effects on performance and ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 127, 33 – 24.
- Al – Rabadi, J.G., Peter, J.T., Barbara, A.W., Wayne, L.B., Michael J.G., 2011. Effect of extrusion temperature and pre-extrusion particle size on starch digestion kinetics in barley and sorghum grain extrudates. *Anim. Feed Scien. Technol.* 168, 267 – 279.
- Ankom Technology 2008 Procedures for fiber and *in vitro* analysis URL:
. http://www.ankom.com/09_procedures/Daisy%20method.pdf
- AOAC, 1991. Official methods of analysis. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Askar, A.R., Guada, J.A., González, J.M., de Vega, A., Castrillo, C., 2006. Diet selection by growing lambs offered whole barley and a protein supplement, free choice: effects on performance and digestion. *Livest. Sci.* 101, 81– 93.
- Askar, A.R., Guada, J.A., González, M.J., de Vega, A., Castrillo, C., 2011. Effects of sodium bicarbonate on diet selection and rumen digestion by growing lambs individually fed whole barley grain and a protein supplement at their choice. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164, 45–52.
- Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88, 9 – 21.
- Baker, A.B.A.A., El Tinay, H.A., Yagoub, A.E.A., 2010. Protein content and digestibility of sorghum (Sorghum Bicolor)-based fermented gruel: effect of supplementation with soybean protein. *EJEAFChe.* 9, 1495-1501.
- Balogun, O.R., Rowe, B.J., Bird, H.S., 2005. Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120, 141 – 150.
- Bárcena, G.R., Mendoza, M.D.G., González, M.S.S., Herrera, H.J.G., Mora, J.G., 2002. Performance and ruminal fermentation in lambs fed sorghum grain treated with anylases. *Agro.* 36, 31- 39.

- Calsamiglia, S., Stern, M.D., 1995. A three-Step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73, 1459-1465.
- Chai, Z.W., Van Gelder, H.A., Cone, W.J., 2004. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 195 – 204.
- Corona, L., Rodriguez, S., Ware, A.E., Zinn, A.R., 2005. Comparative Effects of Whole, Ground, Dry-Rolled, and Steam- Flaked Corn on Digestion and Growth Performance in Feedlot Cattle. *The Prof. Anim. Sci.* 21, 200–206.
- Corona, L., Owens, N.F., Zinn, A.R., 2006. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 84, 3020-3031.
- Correia, I., Nunes, A., Barros, S.A., Delgadillo, I., 2010. Comparison of the effects induced by different processing methods on sorghum proteins. *J. Cereal Sci.* 51, 146 – 151.
- Correia, I., Nunes, A., Saraiva, A.J., Barros, S.A., Delgadillo, I., 2011. High pressure treatments largely avoid/revert decrease of cooked sorghum protein digestibility when applied before/after cooking. *Food Sci. Technol.* 44, 1245 – 1249.
- Crocker, M.L., De Peters, J.E., Fadel, G.J., Perez-Monti, H., Taylor, J.S., Wycroff, A.J., Zinn, R.A., 1998. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. *J. Dairy Sci.* 81, 2394 – 2407.
- Danesh Mesgaran, M., Stern M.D., 2005. Ruminant and post-ruminant protein disappearance of various feeds originating from Iranian plant varieties determined by the *in situ* mobile bag technique and alternative methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118, 31-46.
- Defoor, J.P., Galyean, L.M., Cole, A.N., Jones, R.O., 2000. Effects of planting density and processing method on laboratory characteristics of grain sorghum for ruminants. *J. Anim. Sci.* 78, 2032 – 2038.
- DePeters, J.E., Getachew, G., Fadel, G.J., Zinn, A.R., Taylor, J.S., Pareas, W.J. Hinders, G. R., Aseltine, S.M., 2003. *In vitro* gas production as a method to compare fermentation characteristics of steam-flaked corn. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105, 109 – 122.
- Duodu, K.G., Nunes, A., Delgadillo, I., Parker, M.L., Mills, E.N.C., Belton, P.S., Taylor, J.R.N., 2002. Effect of grains structure and cooking on sorghum and maize *in vitro* protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 35, 161 – 174.
- Ensor, H.H., 1970. A report: Committee on classification of particle size in feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 53, 5-8.
- Faichney, G.J., 1975. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: I. W. McDonald and A. C. I. Warner (Ed.). *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Univ. of New England Publ. Unit. Armidale, Australia.
- Fonseca, M.J.A., Cabrita, J.R.A., Lage, M.A., Gomes, E., 2000. Evaluation of the chemical composition and the particle size of maize silages produced in north – west of Portugal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 173 – 183.
- France, J., Dhanoa, S.M., Theodorou, K.M., Lister, J.S., Davies, R.D., Isac, D., 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associates with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *Journal of Theoretical Biology.* 163: 99 – 11.
- Galyean, M.L., Wagner, D.G., Owens, N.F., 1979. Corn particle size and site and extent of digestion by steers. *J. Anim. Sci.* 49:204.
- Gargallo, S., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2006. Technical note: A modified three-step *in vitro* procedure to determine intestinal digestion of proteins. *J. Anim. Sci.* 84, 2163-2167.

- Guada, J.A., 1993. Efectos del procesado sobre la degradabilidad ruminal de proteína y almidón. IX Curso de especialización FEDNA
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forege fiber analysis. Agriculture Handbook N° 379, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D. C.
- González Ronquillo. M., Fondevila, M., Barrios, U.A., Newman, Y., 1998. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilization and the season of growth. *Animal Feed Science and Technology* 72, 19-35.
- Hamid, P., Akbar, T., Hossein, J., Ali, M.G., 2007. Nutrient Digestibility and Gas Production of Some Tropical Feeds Used in Ruminant Diets Estimated by the *in vivo* and *in vitro* Gas Production Techniques. *Ame. J. Anim. Vet. Sci.* 2 (4), 108 – 113.
- Hill, F.N., Anderson, D.L., 1958. Comparison of metabolizable energy and productive determinations with growing chicks. *Journal of Nutrition* 64:587-603.
- Huck, G.L., Kreikemeier, K.K., Bolsen, K.K., 1999. Effect of reconstituting field-dried and early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. *J. Anim. Sci.* 77:1074–1081.
- Jouany, J.P., 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermented contents. *Food Science* 2, 131-144.
- Koenig, M.K., Beauchemin, A.K., Rode, M.L., 2003. Effect of grain processing and silage on microbial protein synthesis and nutrient digestibility in beef cattle fed barley-based diets. *J Anim Sci.* 81, 1057-1067.
- Lanzas, C., Fox, G.D., Pell, N.A., 2007. Digestion Kinetics of driers cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 265-280.
- Lema, M., Felix, A., Salako, S. Bichnoi, U., 2000. Nutrient content nutrient content and *in vitro* dry matter digestibility of silages made from various grain sorghum and sweet sorghum cultivars. *J. Susta. Agri.* 17:1, 55 — 70.
- Mabjeesh, S.J., Cohen, M., Arieli, A., 2000. *In vitro* methods For measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculums source. *J. Dairy Sci.* 83: 2289 – 2294.
- Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. Semi automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 79, 321–330.
- Mertens, D. R. 1980. Fiber content and nutrient density in dairy rations. *Distillers Feed Conf.* 35:35.
- Miller, R.D., Elliott, R. Norton, W.B., 2008. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme® G2 Liquid, on digestion and utilisation of barley and sorghum grain-based diets by ewe lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 140, 90 – 109.
- Molina, R.L., Rodríguez, M.N., Gonçalves, C.L., Borges, I., de Sousa, M.B., Rodríguez, S. A.J., Lara, C.A., 2000. Dry matter and crude protein degradability of six sorghum silage genotypes (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) harvested at hard dough stage, with or without grain containing tannin. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo. 39, pp. 233-237

- National Research Council. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle (7th Ed.). National Academy Press, Washington, DC.
- Olivera, P.M.R., 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en las técnicas *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. Rev. Prod. Anim. 13, 45-51.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation on protein degradability in the rumen from incubations on measurement weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb. 92, 499-503.
- Ortega, M.E., Mendoza, G., Aguirre, S., Carranco, M.E., 1998. Tratamiento con formaldehído de maíz y sorgo, efecto sobre la degradabilidad ruminal de la materia seca, almidón y proteína bruta. Prod. Sanid. Anim. 13, 13 – 19.
- Owens, F., Zinn, A.R., 2005. Corn grain for cattle: influence of processing on site and extent of digestion. Proc. Southwest Nutr. Conf.: 86 – 112.
- Pell, A.N., Doane, P.H., Schofield, P., 1997 In vitro digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG, pp. 109 - 132.
- Ramos, B.M.O., Champion, M., Poncet, C., Mizubuti, I.Y., Nozière, P., 2009. Effects of vitreousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal *in sacco* degradation of dry matter, starch and nitrogen. Anim. Feed Sci. Tech. 148, 253 – 266.
- Rodríguez, V.C.F., 2005. Valoración nutricional y degradabilidad ruminal de genotipos de sorgo forrajero (*sorghum* sp.) Meso. J. Agro., Agri. and Livest. 16, 215 -223.
- SAS Inc., 2002–2003. SAS System for Windows, Release 9.0 (TS1M3). SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
- Siddons, R.C., Paradine, J., Beaver, D.E., Cornell, P.R., 1995. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. Brit. J. Nutr. 54, 509-519.
- Simpson, E.J., Schake, Jr., L.M., Pflugfelder, R.L., Riggs, J.K., 1985. Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. J. Anim. Sci. 60, 877-882.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1997. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York. 481 pp.
- Theodorou, K.M., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. Anim. Feed Sci. Technol. 48, 185 – 197.
- Theurer, C.B., 1986. Grain processing on starch utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 63, 1649 – 1662.
- Weatherburn, W.M., 1967. Phenol-Hypochloite reaction for determination of ammonia. Analit. Chem., 39, 971 – 975.
- Wolin, M.J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. 43, 1452-1459.
- Zinn, R.A., Alvarez, G.E., Montano, M., Salinas-Chavira, J., 2008. Influence of dry-rolling and tempering agent addition during the steam-flaking of sorghum grain on its feeding value for feedlot cattle. J. Anim. Sci. 86, 916-922.

Efecto del grano de sorgo, procesamiento, eficiencia alimenticia y síntesis de proteína microbiana en terneros

González García UA¹, Corona GL³, Estrada Flores JG² González Ronquillo M^{1*}

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México,

² Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México DF.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue estimar la digestibilidad del grano de sorgo y el flujo de N microbiano, utilizando becerros canulados en rumen y duodeno, así mismo, se evaluaron las bases púricas del aislamiento bacteriano como marcador interno. La digestibilidad ruminal de la MO, almidón y N fue mayor ($P < 0.001$) para los sorgos enteros, mientras que la digestibilidad de FND fue mayor ($P < 0.001$) para SEE. La digestibilidad posruminal de la MO, almidón y N fue mayor para SQE respecto al resto de los tratamientos, así mismo cuando se contrastan por tratamientos la mayor ($P > 0.001$) digestibilidad posruminal la presentan los quebrados con respecto a los enteros. El contenido de N yBP fue similar (184 y 183 $\mu\text{mol/g MO}$) para SEE y SQS, siendo mayor ($P < 0.001$) para SQE. El flujo duodenal de BP fue mayor ($P < 0.001$) para SQE con respecto al resto de los tratamientos, mientras para la excreción de DP no se encontraron diferencias significativas. El sorgo se degrada lentamente en el rumen esperando que proporcione un aumento sustancial de energía a los microorganismos durante el tiempo que permanezca en el rumen para la síntesis de proteína microbiana.

1. Introducción.

Los granos de cereal se han utilizado ampliamente como un alimento de alta densidad energética como un complemento en la dieta basal de forrajes en rumiantes. Los granos comúnmente más utilizados son cebada, sorgo, avena con trigo y maíz siendo el de menor importancia. La eficiencia con la que los carbohidratos componen el grano es utilizado para la síntesis de proteína microbiana en el rumen es considerado como el mayor determinante del valor nutritivo del alimento (Theurer 1986).

La medición de la síntesis de proteína microbiana en los rumiantes ha sido un área importante de estudio en la nutrición proteica de rumiantes. Una estimación de la contribución de proteína microbiana en el flujo de proteína intestinal se incorpora en los sistemas de evaluación de nuevas proteínas que ya se emplean en diferentes países. Una limitante en la comprensión de la síntesis de proteína microbiana, es la falta de métodos simples y precisos de medición de la producción de proteína microbiana in vivo (Chen et al. 1992). La excreción urinaria de derivados púricos (alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina) constituye un método directo del flujo duodenal de las bases púricas y por lo tanto, la producción microbiana ruminal. Este método tiene evita la necesidad de utilizar animales fistulados y sus mediciones relacionadas con la digesta y la cinética de los marcadores microbianos (Martin-Orue et al. 2000). Por otra parte, se evaluó el efecto del sorgo (*soghum bicolor* L moench), alcance del procesamiento (quebrado, entero, quebrado ensilado y entero ensilado) y su digestibilidad en el tracto total y la síntesis de proteína microbiana.

El objetivo del presente estudio fue estimar la digestibilidad del grano de sorgo y el flujo de N microbiano, utilizando becerros canulados en rumen y duodeno, así mismo, se evaluaron las bases púricas del aislamiento bacteriano como marcador interno.

2. Material y métodos

2.1. Animales y dietas

Se utilizaron cuatro terneros (PVi, 190±30 kg) provistos de una canula ruminal y duodenal (cánula tipo T), los cuales fueron alimentados con uno de cuatro tratamientos, distribuidos en un cuadro latino 4 X 4, Sorgo entero seco (SES), Sorgo entero ensilado (SEE), Sorgo quebrado seco (SQS) y Sorgo quebrado ensilado (SQE). Los animales fueron alojados en corraletas individuales (2.80 x 2 m) y tuvieron agua al libre acceso. El consumo de materia seca (CMS) fue restringido al 2% de su PV y se ofreció en igual proporción a las 0800 y 2000 h. Cada periodo experimental tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 d fueron para adaptación a las dietas y los últimos 5 d para la recolección de muestras. La composición de las dietas experimentales se muestra en el **Cuadro 1**. Se utilizo oxido de

chromo (Cr_2O_3) al 0.40% de inclusión en el complemento como marcador de flujo (Corona et al., 2005)

La reconstitución del grano se realizó mediante la adición de agua a todo el grano, para elevar la humedad a 35%, para ello se utilizaron dos muestras, la primera se ensiló a 42 días utilizando grano entero (SEE) y otra se quebró a 1 mm (Molino azteca, 1 mm Ø) y fue ensilado por 21 días (SQE) (SQE) (Huck, 1999; Simpson, 1985). Ambas muestras fueron ensiladas en botes de polietileno con una capacidad de 200L y almacenadas a temperatura ambiente (25 a 27° C) en un cuarto oscuro, para después ser abiertos en el tiempo antes mencionado. Pasado el tiempo de ensilado se extrajo una cantidad de 1000 g de muestra de la parte del centro de cada macrosilo, colocándolo en bolsas de polietileno, y se almacenaron a -20° C para análisis posteriores.

Cuadro 1. Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.

	^a SQE	SEE	SES	SQS
Inclusión % (MS)				
Cereal	73	73	73	73
Alfalfa heno	6	6	6	6
Avena heno	12	12	12	12
Melaza	5	5	5	5
Urea	1	1	1	1
Ortofosfato	0.20	0.20	0.20	0.20
Oxido de magnesio	0.20	0.20	0.20	0.20
Bicarbonato de sodio	0.50	0.50	0.50	0.50
Microminerales ^b	0.05	0.05	0.05	0.05
Sal	0.50	0.50	0.50	0.50
Oxido de cromo ^c	0.40	0.40	0.40	0.40
Composición de los cereales (MS) ^d				
EN, Mcal/kg				
Mantenimiento	1.62	1.62	1.62	1.62
Ganancia	1.03	1.03	1.03	1.03
PC, %	10.76	10.77	10.24	10.69
EE, %	5.75	5.63	5.94	5.61
FND, %	7.54	9.56	14.14	12.85
Ca, %	0.82	0.81	0.76	0.81
P, %	0.26	0.25	0.25	0.24

^aSorgo Quebrado Ensilado (**SQE**), Sorgo Entero Ensilado (**SEE**), Sorgo Entero Seco (**SES**), Sorgo Quebrado Seco (**SQS**).

^bContenido de la premezcla de microminerales: Magnesio 10%, Zinc 10%, Hierro 10%, Cobre 2%, Yodo 0.12%, Selenio 0.06%, Cobalto 0.02%.

^cAdicionado como marcador en la digesta. ^dBasado en los valores de EN (NRC, 1996)

2.2. Toma de muestras

Se utilizaron 200 g de alimento directamente de los silos durante los periodos de muestreo a las 1200 h y fueron congeladas a -20° C para análisis posteriores. Se colectaron muestras de heces (400 g/d) y contenido duodenal (750 mL/ hora de muestreo), durante cuatro días consecutivos, el día 16 a las 0750 y 1350h, el día 17 a las 0900 y 1500h, el día 18 a las 1050 y 1650h y el día 19 a las 1200 y 1800 h. Las muestras fueron almacenadas diariamente y congeladas a -20° C para obtener un pool al final de cada periodo, para análisis posteriores.

Se colecto un spot de 100 ml de orina en contenedores de plástico el día 19 y se les agrego 10 ml de ácido sulfúrico para después ser congeladas a - 20°C para análisis posteriores.

El día 20 se colectaron muestras de liquido ruminal (200 mL) a las 1200 h, para la determinación de pH (Orión 261S, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.), posteriormente se utilizaron 40 ml de liquido ruminal a los cuales le fueron adicionados 10 mL de ácido metafosfórico, previamente filtrado a través de cuatro capas de gasa, y congeladas a -20° C para posteriores análisis (Corona, 2005).

3. Análisis de laboratorio

3.1. Muestras de alimento, heces y contenido duodenal

A las muestras iniciales se determino el contenido de materia seca (MS) en una estufa de aire forzado (60° C, 48 h), posteriormente se molieron (molino Wiley, 1 mm Ø) para determinar Cenizas (600° C por 3 h), y su diferencia para Materia Orgánica, así como el contenido de aNDF-NDF (Goering y Van Soest, 1970) utilizando alfa amilasa (ANKOM FAA), se determino el N utilizando el método Kjeldahl (AOAC, 1991) y la proteína cruda (PC) fue calculada como N X 6.25, almidón (Zinn, 1990). Para el contenido duodenal se determino N-NH₃ (Chaney et al., 1962) y bases púricas (BP) (Balcells et al., 1992), se aislaron bacterias del contenido ruminal (Martín Orue et al., 1998) para determinar la materia orgánica microbiana (MOM) y el nitrógeno microbiano (NM). Para la determinación de energía bruta (EB) se utilizó una bomba calorimétrica adiabática PARR® (Gallenkamp, Automatic Adiabatic Bomb). La digestión del marcador (Cr) se realizo

mediante la técnica descrita por **Hill y Anderson (1958)**, posteriormente la concentración del marcador (Cr_2O_3) en duodeno y heces se determinó por espectrofotometría de absorción atómica, después de la solubilización de las muestras incineradas (**Siddons et al., 1985**).

Los derivados púricos (DP) (alantoína y ácido úrico) y creatinina en orina fueron analizadas utilizando HPLC (**Balcells et al., 1992; Martín-Orue et al., 1996**). Las BP en el rumen y contenido de la digesta duodenal fue determinada después de la hidrólisis de las muestras por HPLC (**Martín-Orue et al., 1996**)

3.2. Cálculos y análisis estadísticos

El flujo duodenal de BP y de nutrientes se calcularon en función del óxido de cromo respectivamente (Galyean, 2010). El N microbiano fue determinado directamente del duodeno utilizando las BP como marcador microbiano e indirectamente utilizando la excreción urinaria de DP de acuerdo al modelo propuesto por González-Ronquillo et al., (2003), $y = 58.86 + 0.70x$, donde y es el derivado púrico excretado en orina (alantoína más ácido úrico, mmol/d) y x es el flujo de BP en duodeno (adenina más guanina, mmol/d). Asumiendo que la mayoría de BP proviene de los microbios digeridos, el flujo de microbios duodenales fue calculado utilizando BP:N de la digesta duodenal y las bacterias aisladas del rumen [$\text{NM} = (\text{BP:NNA})_{\text{duodeno}} / (\text{BP:N})_{\text{bacterias}}$].

Los datos fueron analizados utilizando un diseño de cuadro latino 4 X 4 (Cochran y Cox, 1957) con el procedimiento PROC GLM de SAS (2002) (Versión 9.0, SAS Inst., Inc., Cary, NC) bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde, μ es la Media general, P_i es el efecto del periodo, A_j es el efecto del animal, T_k es el efecto debido al tratamiento y ε_{ijk} es el error aleatorio. Los efectos de los tratamientos en las características de digestibilidad y flujos fueron analizados utilizando contrastes ortogonales: SEE SQE vs SES SQS y SQS SQE vs SES SEE

4. Resultados

4.1. Consumo y digestibilidades

El consumo promedio al día, la digestibilidad aparente en el rumen y el tracto total de la MO, Almidón, y N se presentan en el **cuadro 2**. La digestibilidad ruminal de la MO, almidón y N fue mayor ($P < 0.001$) para los sorgos enteros, mientras que la digestibilidad de FND fue mayor ($P < 0.001$) para SEE. Cuando se contrastan por tratamientos no se encontró diferencia significativa para la digestión ruminal de MO y FND. La digestibilidad posruminal de la MO, almidón y N fue mayor para SQE respecto al resto de los tratamientos, así mismo cuando se contrastan por tratamientos la mayor ($P > 0.001$) digestibilidad posruminal la presentan los quebrados con respecto a los enteros. La digestibilidad total de la MO, almidón y N, fue mayor ($P < 0.001$) para SQE respecto al resto de los tratamientos. Cuando se contrastan por tratamiento no existe diferencia significativa entre los enteros vs quebrados en la digestibilidad total para MO, N y FND, mientras que los ensilados mostraron la mayor digestibilidad de MO, almidón, N y FND.

Cuadro 2. Consumo diario (g/d) de MS, MO, Almidón y N, coeficiente (%) de digestibilidad aparente en el tracto total y rumen.

Cereales ¹	SQE	SEE	SES	SQS	EEM ²	P <	S vs En	E VS Q
Consumo (g/d)								
MS	4580	4580	4580	4580				
MO	4481	4484	4509	4506				
Almidón	2719	2570	2505	2515				
N	93	93	90	92				
FND	746	814	968	920				
EB, Mcal/d	23	23	23	23				

Digestibilidad aparente

Digestión ruminal %

MO	55 ^a	59 ^b	60 ^b	53 ^c	0.09	0.001	0.28	0.31
Almidón	59 ^a	65 ^b	64 ^b	54 ^c	0.08	0.001	0.001	0.001
N	40 ^a	48 ^b	45 ^c	40 ^a	0.02	0.048	0.51	0.001
FND	66 ^a	71 ^b	66 ^a	68 ^a	0.01	0.001	0.23	0.34
Digestión posruminal, %								
MO	71 ^a	58 ^b	48 ^c	52 ^c	0.01	0.001	0.001	0.001
Almidón	82 ^a	63 ^b	52 ^c	74 ^d	0.02	0.001	0.001	0.001
N	77 ^a	67 ^b	53 ^c	54 ^c	0.01	0.001	0.001	0.001
FND	34 ^a	29 ^b	19 ^c	15 ^d	0.02	0.001	0.12	0.23
Tracto total								
MO	87 ^a	83 ^b	79 ^c	77 ^d	0.04	0.001	0.001	0.14
Almidón	93 ^a	87 ^b	83 ^c	88 ^b	0.07	0.001	0.001	0.001
N	86 ^a	83 ^b	74 ^c	72 ^d	0.04	0.001	0.001	0.42
FND	78 ^a	79 ^a	73 ^b	73 ^b	2.79	0.001	0.001	0.23

¹Sorgo Quebrado Ensilado (**SQE**), Sorgo Entero Ensilado (**SEE**), Sorgo Entero Seco (**SES**), Sorgo Quebrado Seco (**SQS**). En: sorgos ensilados, S: sorgos secos; E: sorgos enteros, Q: sorgos quebrados. ²EEM = Error estándar de la media, literales dentro de la misma fila son significativamente diferentes (P <0.005)

4.2. Composición química del extracto microbiano ruminal

El contenido de MO no presenta diferencia significativa entre extractos bacterianos ($91.6 \pm 1.2\%$ y $88.68 \pm 0.9\%$ para los extractos de BAL y BAS, respectivamente (**Cuadro 3**). El contenido de N fue mayor ($P < 0.001$) para SEE con respecto al resto de los tratamientos. El contenido de N yBP fue similar (184 y $183 \mu\text{mol/g MO}$) para SEE y SQS, siendo mayor ($P < 0.001$) para SQE.

Cuadro 3. Concentración de MO, N, bases púricas (BP) y la relación BP:N de las bacterias aisladas a partir de la fase líquida (BAL) o sólida (BAS) del contenido ruminal.

	Tratamientos							
	SQE	SEE	SES	SQS	EEM	P<	S vs En	E vs Q
MO (g/100 g MS)								
BAS	91.7	91.6	91.6	91.5	0.11	0.93	0.76	0.58
BAL	88.76	88.62	88.82	88.52	0.09	0.64	0.23	0.66
N (g/100 g MS)								
BAS	8.10 ^a	8.67 ^b	8.07 ^a	8.06 ^a	0.41	0.001	0.001	0.001
BAL	9.51 ^a	10.18 ^b	9.48 ^a	9.46 ^a	0.48	0.001	0.001	0.001
BP ($\mu\text{mol/g MO}$)								
BAS	135 ^a	117 ^c	109 ^b	115 ^c	0.02	0.001	0.001	0.017
BAL	196 ^a	184 ^b	184 ^b	183 ^b	0.01	0.003	0.014	0.031
BP:N ($\mu\text{mol/g MO}$)								
BAS	1.67 ^a	1.35 ^b	1.35 ^b	1.43 ^b	0.01	0.001	0.001	0.001
BAL	2.06 ^a	1.81 ^c	1.94 ^{ab}	1.93 ^b	0.01	0.001	0.001	0.001

¹Sorgo Quebrado Ensilado (**SQE**), Sorgo Entero Ensilado (**SEE**), Sorgo Entero Seco (**SES**), Sorgo Quebrado Seco (**SQS**). En: sorgos ensilados, S: sorgos secos; E: sorgos enteros, Q: sorgos quebrados. ²EEM = Error estándar de la media, literales dentro de la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.005$)

4.3. Flujo duodenal total y N microbiano

El flujo duodenal total del NNA, BP y NM se muestran el **cuadro 4**. Los tres procedimientos fueron utilizados para estimar el flujo duodenal de BP: medidas directas en las muestras de digesta duodenal. El N que llega al duodeno así como el N-NH₃ no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. El flujo duodenal de BP fue mayor ($P < 0.001$) para SQE con respecto al resto de los tratamientos, mientras para la excreción de DP no se encontraron diferencias significativas. Como un indicador de flujo duodenal de BP, la excreción urinaria de DP produce valores altos (299 mmol/d) que los obtenidos por el óxido de cromo, los valores de flujo del NM reflejados en el flujo de BP duodenales, siempre fueron relacionados a los valores de síntesis de proteína con el método utilizado.

Cuadro4. Consumo de N y flujo duodenal (g/d) de N, N-NH₃, NNA, bases púricas (BP mmol/d) utilizando óxido de cromo como marcador. El flujo de BP se estimó indirectamente basado en la excreción de derivados púricos en la orina. En todos los casos, el N microbiano fue calculado en la relación BP y N (BP:N) determinado del aislamiento de bacterias asociadas al sólido (BAS) y al líquido (BAL).

	Tratamientos							
	SQE	SEE	SES	SQS	EEM	P<	S vs En	E vs Q
Consumo N g/d	93.09	93.83	90.49	92.32	0.53	0.98		
N Duodenal g/d	56	49	50	56	2.00	0.48		
N-NH ₃ Duodenal g/d	1.61	1.54	1.50	1.77	0.10	0.79	0.41	0.64
NNAD g/d	54.22	47.20	48.75	53.98	1.88	0.43	0.11	0.80
NMD g/d	29.06 ^a	35.15 ^b	21.66 ^c	22.51 ^c	0.94	0.001	0.17	0.001
PB (mmol/d)								
Oxido de cromo	86.52 ^a	77.35 ^b	80.37 ^c	81.2 ^c	1.02	0.001	0.001	0.001
DP en orina	179	181	182	180	0.76	0.26	0.06	0.60

SQE: sorgo quebrado ensilado; SEE: sorgo entero ensilado; SES: sorgo entero seco; SQS: sorgo quebrado seco.

NNAD = Nitrógeno no amoniacal duodenal

DMN = N microbiano duodenal

5. Discusión

El sorgo es uno de los cereales más utilizados en los sistemas intensivos de ganado de carne como fuente principal de energía. Sin embargo; el contenido de nitrógeno puede ser insuficiente para una óptima fermentación ruminal. En consecuencia, los animales que reciben dietas basadas en cereales útiles para estudiar los cambios en la producción microbiana inducida por aumento de la proteína degradable en rumen suplementada. Por otra parte, el bajo contenido de BP en las dietas utilizadas para este experimento junto con su degradación ruminal, validan el uso de BP como marcador microbiano (Martín-Orúe et al. 2000)

5.1. Consumo y digestibilidades

La digestión ruminal de la MO para SEE fue mayor ($P < 0.001$) a los resultados obtenidos por **Zinn et al. (2008)** con una digestión ruminal del 56% respectivamente en sorgo rolado seco (SRS). La digestión del almidón fue menor para SQE (59%) y SQS (54%) con respecto al resto ($63 \pm 2\%$), esta diferencia puede deberse a que tiene un menor tiempo de retención ruminal los tratamientos quebrados con respecto a los enteros (**Theurer et al., 1999**). La digestibilidad ruminal del N fue menor a lo obtenido por **Hibberd et al. (1985)**, reportando un 55% de digestión al utilizar sorgo reconstituido, esto puede ser debido a los diferentes tipos de sorgo que utilizo (amarillo, rojo y café) y con ello una degradación ruminal diferente, los cuales tuvieron una mayor proporción de nitrógeno al igual que el porcentaje de inclusión (88%) al utilizado en el presente estudio.

La digestión post ruminal de la MO fue mayor (71%) en SQE con respecto a los demás tratamientos ($P < 0.001$), siendo menor para SQS. **Hart (1987)** al utilizar SRS encuentran una digestibilidad post ruminal de la MO del 70% similar al SQE, lo anterior podría deberse a que el grano molido y reconstituido mejora la digestibilidad posruminal de la MO (**Riggs et al., 1970**). La digestión posruminal del almidón en el presente estudio fue mayor

($P < 0.001$) para SQE con respecto al resto de los tratamientos, seguido por el SQS y la menor para SES. **Zinn et al. (2008)** reporta un valor de digestión posruminal para el almidón en el sorgo rolado seco del 71%, el cual es similar al obtenido al SQS del presente estudio, por otro lado **Zinn et al. (2008)** al utilizar sorgo hojueado al vapor, encuentra una digestibilidad post ruminal del almidón de 95%, el cual es superior a los encontrados en el presente estudio, esta diferencia podría deberse a las alteraciones en el escape de fermentación ruminal las cuales afectarían las cantidades de almidón que llegan al duodeno, por lo que un adecuado efecto de procesamiento del grano cambia el sitio de digestión del almidón, por lo que una disminución en la densidad del hojueado, aumenta la digestión posruminal del almidón (**Theurer, 1986; Noceck et al., 1991**). La digestión posruminal del N (%) fue mayor ($P < 0.001$) para SQE con respecto a los demás tratamientos, siendo menor para SES y SQS ($54 \pm 0.5 \%$), **Hibberd et al. (1985)**, encuentran una digestibilidad del N a nivel intestinal del 73% utilizando sorgo reconstituido, el cual es similar al SQE del presente estudio

5.2. Composición química del extracto microbiano ruminal

De acuerdo con la literatura, BAS muestra un mayor contenido de cenizas debido a su alta capacidad de captar sales durante el proceso de aislamiento (Martín-Orúe et al., 2000). Por otra parte el contenido de N y BP así como la proporción de BP:N fue mayor para BAL que para BAS reflejando la composición de especies dominantes o la diferencia en la actividad metabólica (Bates et al., 1985). Los cambios en BP:N puede ser asociado por las diferentes especies bacterianas o la tasa de crecimiento. Sin embargo; existe información que sugiere que el proceso de aislamiento puede tener una implicación importante, considerando la baja eficiencia en la separación de las bacterias adheridas y su recuperación incompleta (González et al., 2004). Los resultados obtenidos indican que la disponibilidad del N degradable aumenta la concentración de proteína en los microorganismos por la utilización de los carbohidratos (McAllan et al., 1977; Craig et al., 1987). En general, el extracto BAL da una alta relación BP:N y una alta estimación de la síntesis de proteína microbiana que BAS cuando las BP son utilizadas como marcadores microbianos. Es difícil establecer una contribución y síntesis real del total de la síntesis de proteína microbiana en el rumen por BAS, tanto composición es incierta y el hecho de que su impacto depende del tipo de dieta.

En cualquier caso, los microorganismos pueden ser asociados con varias fases del rumen, y el sistema de fase doble (BAL/BAS), siempre es una simplificación de la situación real (González et al., 2004)

5.3. Excreción urinaria de DP

Aunque la baja recuperación de DP fue menor a lo reportado por la literatura (González et al., 2004; Martín-Orúe et al., 2001) por lo tanto, los cambios en el flujo de DP pueden ser atribuidos en los cambios de absorción de las BP. De acuerdo con trabajos previos, la alantoína aumenta cuando se suplementa con proteína efectiva degradable en rumen y la excreción de ácido úrico tiende a disminuir (Martín-Orúe et al., 2000). En el presente estudio, el promedio de la excreción urinaria de DP (180.5 ± 1.6) fueron mayores a lo reportado por Martín-Orúe et al. (2000) quienes encuentran una concentración total de DP de 76.5 y 83.4 utilizando maíz y cebada en la dieta experimental, lo cual puede ser explicado por los altos niveles de actividad de la xantina oxidasa (es la enzima responsable de la oxidación de la xantina e hipoxantina en ácido úrico). Las diferencias en la excreción de DP puede ser resultado de la variación en el flujo duodenal de las BP exógenas, especialmente en el ganado, en los que las purinas endógenas y exógenas constituyen dos compartimentos diferentes (González et al., 2004).

5.4. Síntesis de proteína microbiana, mediciones duodenales

Los carbohidratos basados en fuentes de grano como puede ser el sorgo, que relativamente son degradados lentamente en el rumen, podría esperarse que proporcione un suministro de energía más uniforme permitiendo una mejor sincronía con el nitrógeno del forraje, además, se consideran que los diferentes tipos de almidones es el factor más importante en esta respuesta diferencial (Horadagoda et al., 2008). Para el cálculo de N microbiano a partir de la excreción urinaria, la proporción entre el N total o el nitrógeno no amoniacal (g/kg) y las purinas (mmol/d) en la digesta se asume que es constante. En una mezcla de biomasa microbiana fue medida una proporción entre el N de purinas y el N total, obteniendo 0.116 g/g (Chen et al., 1992b). Sin embargo; la proporción no es constante entre diferentes grupos de microorganismos y dentro de los mismos, sino que varía a un número de razones, ej. Consumo de alimento y tasa de flujo ruminal, tipo y disponibilidad de

sustrato, tasa de crecimiento microbiano, sitio y tiempo post alimentación, y los métodos de análisis juegan un papel importante (Rodríguez et al., 2000). El nivel de alimentación restringida afecta el flujo duodenal de BP, sin tener en cuenta el método de estimación. La disminución en el flujo de BP duodenales tiende a ser significativa cuando se estima directamente. La alta sensibilidad de los DP es, en parte, un resultado residual en la variación de los valores de los DP estimados (González et al., 2004)

6. Conclusión

La excreción de DP en la orina son de utilidad como una medida para detectar los cambios en la síntesis microbiana ruminal, al menos con la misma eficacia que las mediciones duodenales basadas en las técnicas de marcadores. Por otro lado, los granos de degradación lenta tales como el sorgo, tienen un efecto sinérgico positivo. Presumiblemente, la razón para una alta digestibilidad de los componentes de la dieta en el tracto total con los granos lentamente degradables fue un aumento en la síntesis de proteína microbiana.

Bibliografía.

- AOAC, 1991. Official methods of analysis. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Balcells, J., Guada, J. A., Peiró, J.M., Parker, D.S. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575: 153-157.
- Bates, D. B., Gillett, J. A., Barao, S. A., Berger, W. G. 1985. The effect of specific growth rate and stage of growth on nucleic acid-protein values of pure cultures and mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 61, 713-724.
- Chaney AL, Marbach EP. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8, 130 – 132.
- Chen, X. B. and Gomes, M. J. 1992a. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives an overview of technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB2 9SB, UK Occasional Publication 1992
- Chen, X. B., Chen, Y. K., Franklin, M. F., Ørskov, E. R., Shand, W. J. 1992b. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.* 70, 1534–1542.
- Cochran W.G and Cox G.M. 2nd ed. Oxford, England: John Wiley and sons (1957) xiv, pp 611.

- Corona, L., Rodriguez, S., Ware, A.E., Zinn, A.R., 2005. Comparative Effects of Whole, Ground, Dry-Rolled, and Steam- Flaked Corn on Digestion and Growth Performance in Feedlot Cattle. *The Prof. Anim. Sci.* 21, 200–206.
- Craig, W. M., Brown, D. R., Broderick, A., Ricker, D. B. 1987a. Post-pandrial composition changes of fluid and particle-associated ruminal microorganism. *J. Anim. Sci.* 65, 1042-1048.
- Galyean, M. L. Laboratory procedures in animal nutrition research, revisado mayo 2010.
- Goering, H. K. and P. I. Van Soest. 1970. Forage fiber analysts (*apparatus*, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook 379. ARS, ASDA. Washington, DC.
- González-Ronquillo, M., Balcells, J., Guada, J. A. and Fernando, V. 2003. Purine derivatives excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic supply. *Journal of Dairy Science.* 86: 1282-1291.
- González-Ronquillo, M., Balcells, J., Belenguer, A., Castrillo, C. and Mota, M. 2004. A comparison of purine derivates excretion with conventional methods as índices of microbial yiel in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 87: 2211-2221.
- Hibberd C.A, Warner D.G. and Hintz R.L. 1985. Effect of sorghum grain variety and reconstitution on side and extent of starch and protein digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 61:703-712.
- Hill F.N. and Anderson D.L. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive determinations with growing chicks. *J. Nutr.* 64:587-603.
- Horadagoda, A., Fulkerson, w. j., Barchia, I., Dobos, C. R., Nandra, S. K. 2008. The effects of grain species, proccissing and time of feeding on the efficiency of feed utilization and microbial protein synthesis in sheep. *Livestock Science.* 114: 117-126.
- Huck, G.L., Kreikemeier, K.K., Bolsen, K.K., 1999. Effect of reconstituting field-dried and early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. *J. Anim. Sci.* 77:1074–1081.
- Martín-Orue, S. M., Daposa, C., Balcells, J. and Castrillo, C. 1996. Purine derivates excretion in lactating ewes fed straw diets with different levels of fishmeal. *Animal Feed Science and Technology.* 63: 341-346.
- Martín-Orúe S. M, Balcells J., Zakraoui F., Castrillo C.1998. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Animal Feed Science and Technology* 71: 269–282
- Martin-Orue, M. S., Balcells, J., Guada, J. A. and Fondevila, M. 2000. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures. *Animal Feed Science and Technology.* 88: 171-188.
- Orellana Boero, P., Balcells, J., Martín-Orúe M. S., Liang, b.j., Guada, A. J. 2001. Excretion of purine derivates in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous Purine bases. *Livestock Production Science.* 68: 243-250.

- McAllan, A.B., Smith, R.H., 1977. Some effects of variation in carbohydrate and nitrogen intakes on the chemical composition of mixed rumen bacteria from young steers. *Br. J. Nutr.* 37, 55-65.
- Nocek, J. E. y Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science* 74, 3598-3629.
- Riggs J. K. and McGinty. 1970. Early harvested and reconstituted sorghum grain for cattle. *J. Anim. Sci.* 31: 991-995.
- Siddons R. C. Nolan J. V., Beever D. and MacRae J. C. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of nitrogen. *Br. J. Nutr.* 54: 175-187.
- Simpson, E.J., Schake, Jr., L.M., Pflugfelder, R.L., Riggs, J.K., 1985. Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. *J. Anim. Sci.* 60, 877-882.
- Spicer L.A., Theurer C.B., Sowe J. and Noon T.H. 1986. Ruminal and posruminal utilization of nitrogen and starch from sorghum grain, corn and barley based diets by beef steers. *J. Anim. Sci.* 62:521-530.
- Theurer C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *Journal. Animal. Science.* 63:1649-1662
- Theurer C. B., Lozano O., Alio A., Delgado-Elorduy A., Sadik M., Huber J. T. and Zinn R. A. 1999. Steam-processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by steers. *J Anim Sci.* 77:2824-2831.
- Zinn, R.A. 1990. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 68:767-775.
- Zinn R. A., Alvarez E. G., Montano M. and Salinas-Chavira J. 2008. Influence of dry-rolling and tempering agent addition during the steam-flaking of sorghum grain on its feeding value for feedlot cattle. *J Anim Sci.* 86:916-922.

VII. Conclusiones

- 1.** El heno de chícharo puede ser utilizado en dietas para corderos hasta un 75% de inclusión sin que afecte el consumo y la digestibilidad. El método de producción de gas in vitro es una herramienta utilizada para seleccionar los ingredientes para el balanceo de raciones ya que los datos obtenidos a partir de la digestibilidad aportan una adecuada estimación real de la calidad nutricional del alimento.
- 2.** El procesado adecuado de los granos aumenta la digestibilidad de los nutrientes que entran al tracto digestivo de los rumiantes, así mismo, los estudios in vitro indican que la digestión de la materia seca por los microorganismos ruminales puede ser más eficiente si el grano ha sido procesado adecuadamente. En nuestro estudio los granos de sorgo reconstituidos tuvieron una respuesta favorable en la disponibilidad de los nutrientes, comparado con los granos secos. Los datos obtenidos por la producción de gas para predecir la respuesta animal se logra mejor cuando las limitaciones del sistema son conocidos.
- 3.** La excreción de DP en la orina son de utilidad como una medida para detectar los cambios en la síntesis microbiana ruminal, al menos con la misma eficacia que las mediciones duodenales basadas en las técnicas de marcadores. Por otro lado, los granos de degradación lenta tales como el sorgo, tienen un efecto sinérgico positivo. Presumiblemente, la razón para una alta digestibilidad de los componentes de la dieta en el tracto total con los granos lentamente degradables fue un aumento en la síntesis de proteína microbiana.