



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



ESPECIALIZACIÓN EN PRODUCCIÓN OVINA

TRABAJO FINAL

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS
IN VITRO DEL SALVADO DE MAÍZ**

POR:

ING. ISMAEL RUBIO CERVANTES

TUTOR:

DR. JOSE L. BORQUEZ G.

2014-2015

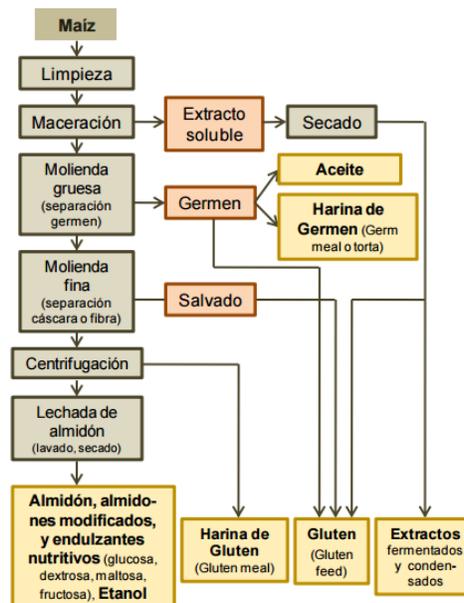
INTRODUCCIÓN

LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS GRANOS

La industria de la elaboración de harina de maíz, almidones, féculas y levaduras contribuye al 13.1% del valor bruto de la cadena productiva de este grano en México (Financiera Rural, 2011).

El salvado de maíz corresponde a la fracción fibrosa, no leñosa que se obtiene luego de la extracción de los almidones contenidos en la semilla para la industria de la producción de harinas para consumo humano (**Figura 1**). El pericarpio es la parte estructural más externa del grano y se divide en tres capas; epicarpio (0.7 a 1 mm) mesocarpio (4 a 6 mm) y endocarpio, el espesor del pericarpio normalmente varía de 60 a 80 mm, está formado por un tejido denso y correoso, cuya composición es 69.7 % fibra, 19.1 % proteína, 7.3 % almidón, 1 % grasa y 4.4 % de otras sustancias (Bartolo-Pérez et al., 1999). La fibra está formada fundamentalmente por: Hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0,%) (Burga y Duensing, 1989).

Figura 1. Proceso de molienda húmeda de maíz (*Zea mays*)



Fuente: Modificado de Financiera Rural (2011).

Los almidones son la forma de almacenamiento de carbohidratos por la mayoría de las plantas cerealeras, la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la hidrólisis enzimática influencia la digestibilidad de los carbohidratos y por lo tanto determina la cantidad de energía obtenida por el animal (De Peters et al., 2007).

La cantidad de carbohidratos no estructurales mantiene una correlación positiva con el potencial de producción de gas *In Vitro* (PG) y la producción de gas a 6 h ($P < 0.05$), 24 h ($P < 0.001$) y 48 h ($P < 0.001$) de incubación (Getachew et al., 2002).

De acuerdo a la PG *In Vitro* las especies de cereales más significativas fueron ordenadas de la siguiente manera; trigo> triticale> avena> cebada> maíz> arroz y sorgo (Opatpatanakit et al., 1994). Debido a que la producción ganadera comercial a menudo se basa en uno o dos de estos granos de cereales, las diferencias inter específicas suelen ser más relevantes que las diferencias entre especies. Son pocos los informes en la literatura que discuten comparaciones dentro de especies.

El tratamiento con vapor incrementa la susceptibilidad del almidón a la acción de las enzimas por el incremento en la superficie de contacto y por el incremento en la permeabilidad de la capa que rodea el endospermo (De Peters et al., 2007)

LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

Medir la digestibilidad *In Vivo* de los alimentos tiene algunas desventajas como altas inversiones económicas; cantidad de los piensos y número de animales necesarios para una muestra representativa además de presentar diversas dificultades asociadas al procedimiento; jaulas metabólicas prácticas, arneses eficientes para colecta de heces y orina, periodo de acostumbamiento, por esto se han desarrollado técnicas *In Situ* e *In Vitro* para predecir la degradación ruminal.

La técnica de producción de gas *In Vitro* (PG) se ha desarrollado como una herramienta predictiva para evaluar la cinética de la fermentación. El uso de la técnica de producción de gas *in vitro* para calcular la digestión de los alimentos se

basa en las relaciones medidas entre la digestibilidad in vivo de los alimentos y en la producción de gas in vitro, en combinación con la composición química de la alimentación (Menke y Steingass, 1988).

La técnica parte de la premisa de que el gas producido en los cultivos de los frascos inoculados está directamente relacionada con la cantidad de sustrato fermentado (López, 2007). Se han observado relaciones entre el perfil de PG y parámetros *In Vivo*, como la digestibilidad y el consumo de alimento (Blümmel and Ørskov, 1993).

La técnica de PG, simula la fermentación en el rumen y podría ser usada para predecir los patrones de fermentación ruminal. Únicamente un limitado número de estudios ha relacionado realmente los perfiles de PG de los alimentos y los Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) producidos (Brown et al., 2002). Sin embargo ha sido ampliamente utilizada para evaluar el valor de la energía de distintos tipos de alimentos (Getachew et al., 1998).

La producción de gas por si solo es un pobre predictor de la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS), pero la inclusión de CP, NFC, y los niveles de grasa en las ecuaciones de predicción mejoró sustancialmente él predicción de IVTD de la producción de gas (Getachew et al., 1998).

Los factores asociados a la naturaleza del líquido ruminal utilizado como inculo; tipo racial del animal, estado fisiológico, características de la dieta, momento de la alimentación, horario de colecta del líquido, Son la principal causa de las diferencias en las pruebas de fermentación *In Vitro* (Craig et al., 1987) además de esto, las modificaciones a la técnica en cada laboratorio debidas las condiciones particulares determinan una variación considerable (Getachew et al., 2002). En razón de lo anterior para obtener valores de referencia útiles en la industria de los alimentos balanceados se debe ser consistente en la ejecución de los procedimientos de laboratorio.

La producción de gas in vitro y la degradabilidad son similares entre liquido de ovejas y ganado bovino. Por lo tanto ovejas pueden ser utilizados como donantes

microbianos para esas estimaciones. Sin embargo, la cinética de la producción de gas difiere entre las especies, por lo tanto los resultados de cinética de producción en ovejas no pueden extrapolarse a ganado mayor (Ives et al., 2005).

Objetivo

Evaluar la composición química y determinar la cinética de fermentación in vitro del salvado de maíz (*Zea mays*).

Materiales y Métodos

Materiales

Equipo

- a) Botellas de 160 ml de capacidad.
- b) Tapones de caucho.
- c) Balanza analítica.
- d) Transductor para medir la presión.
- e) Estufa de aire forzado.
- f) Placas de calentamiento.
- g) Mufla.
- h) Tanque de CO₂ con mangueras para burbujear.
- i) Baño de agua a o incubadora a 39°C.
- j) Garrafas térmicas.
- k) crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 a 160- μ m tamaño de poro) o Papel filtro Whatman de cenizas conocidas #41 o 541, de 12.5 cm de diámetro.

Reactivos

- a) Solución micro-mineral (13.2 g de CaCl₂ 2H₂O, 10 g de MnCl₂ 4H₂O, 1.0 g de CoCl₂ 6H₂O, 8.0 g de FeCl₃ 6H₂O, en 100 ml de H₂O destilada)
- b) Solución buffer (4.0 g de NH₄HCO₃, 35 g de NaHCO₃, en 1L de H₂O destilada).
- c) Solución macro-mineral (9.45 g de Na₂HPO₄ 12H₂O, 6.20 g de KH₂PO₄, 0.60 g de MgSO₄ 7H₂O, en 1L de H₂O destilada).

- d) Solución Resazurina (0.1g/100 ml de agua destilada).
- e) Agente reductor (625 mg de Cisteína-HCl 1H₂O, 95 ml de agua destilada, 4 ml de NaOH 1N, 625 mg de Sulfito de sodio).

Métodos

La técnica de producción de gas in vitro es otro método que permite determinar la extensión y la cinética de degradación de alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso de fermentación. El procedimiento de producción de gas utilizando partículas de sustratos molidos, medio anaeróbico y líquido ruminal, la diferencia es que las incubaciones se realizan en botellas cerradas, lo que permite que los gases producidos por la fermentación del sustrato se acumulen en la parte superior de la botella. Un transductor de presión ajustado se utiliza para medir la presión y permite la liberación de los gases acumulados en las botellas incubadas. Al repetir el procedimiento de las mediciones de gas a intervalos regulares, es posible construir los perfiles de la acumulación del gas producidos por la fermentación de los alimentos evaluados. La tasa y extensión de la fermentación también puede ser calculado.

Preparación de las muestras

- a) Colocar las muestras (forrajes, hojas de árboles, dietas integrales) en bolsas de papel para ser secadas en estufa de aire forzado a 45°C durante 48 h o hasta alcanzar peso constante y posteriormente ser pasadas por la malla de 1 mm de un molino Willey.
- b) Antes del inicio del experimento, las botellas (160 ml de capacidad) para la incubación deben ser lavadas con abundante agua y secadas en una estufa a 100°C durante 12 horas. Después del secado.
- c) Pesar por triplicado 1 g de muestra con una tolerancia de ± 0.0020 g en cada botella previamente identificada y deben ser organizadas en bandejas de plástico para su fácil manejo.

Preparación del medio nutritivo

- a) Para la preparación de 900 ml de medio nutritivo deben mezclarse 0.1 ml de solución micro-mineral, 200 ml de solución buffer, 200 ml de solución macro-mineral, 1 ml de solución rezasurina y 500 ml de agua destilada.
- b) Previamente se debe calcular la cantidad necesaria de medio nutritivo para cada corrida o prueba y deben mezclarse las soluciones bajo flujo constante de CO₂ durante 2 o 3 horas, a continuación agregue una pequeña cantidad de agente reductor (aproximadamente 2 ml por litro de solución buffer). Continúe la gasificación hasta que la rezasurina en el medio adquiera una leve coloración rosa.
- c) Dispensar 90 ml de medio nutritivo en cada una de las botellas incluyendo blancos inmediatamente deben cerrarse las botellas con tapones de caucho y deben ser mantenidas a 4°C para evitar cualquier tipo de fermentación.

Obtención del inóculo

- a) Para implementar la técnica de producción de gas *in vitro* en la evaluación nutritiva de los alimentos para rumiantes, es necesario contar con animales canulados en rumen. Después de la cirugía, se necesita de cuidados postoperatorios, periodo en el cual se hace necesario la aplicación de: antibióticos, antiinflamatorios y cicatrizantes. Para el caso particular de los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) el periodo de recuperación es de aproximadamente 20 días. A partir del cual, los animales están listos para la extracción del líquido ruminal.
- b) Un mínimo de 2, preferiblemente 3 personas tienen la obligación de colectar el líquido ruminal e inocular cada una de las botellas. El líquido ruminal debe colectarse preferiblemente por la mañana antes de alimentar a los animales donadores, por vía esofágica o directamente del rumen (animales fistulados) y debe mantenerse caliente en garrafas térmicas (previamente calentadas con agua a 40°C) para su transporte hasta el laboratorio.

- c) El líquido ruminal debe filtrarse a través de 4 capas de gasa o paño de algodón y colectarse en un matraz graduado mantenido en baño maría a 39°C y continuamente saturado con CO₂. El inóculo ahora está listo para su uso.

Inoculación e incubación

- a) Mientras el inóculo se está preparando, las botellas deben ser llevadas a una incubadora o baño maría a 39°C (preferiblemente 5h antes de la inoculación).
- b) Utilizando una jeringa de 10 ml y 21 de calibre 1,5 en (0,8 × 40 mm), agujas (código de color verde), 10 ml de inóculo se inyecta en cada botella. Agitar (esta agitación debe ser muy suave para evitar que las partículas de muestra sean adheridas a las paredes de las botellas) y retornar las botellas a la incubadora o al baño maría (39°C).

Mediciones

- a) Un transductor es utilizado para medir la presión (psi=libras por pulgada cuadrada) de los gases acumulados en la parte superior de las botellas. El transductor de presión debe ser conectado a una válvula de tres salidas. La primer salida debe ser conectada a una aguja (0.6 mm), la segunda conectada al transductor de presión y la tercera sirve para eliminación del gas en cada lectura (la tercer salida debe estar cerrada durante la medición de la presión de cada botella y debe abrirse solo para la eliminación de los gases después de la medición).
- b) Para la medición de la presión, la aguja acoplada a la válvula debe ser insertada través de la tapa de caucho de cada botella. Las lecturas se deben realizar a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 y 96 h después de la inoculación. Después de cada lectura las botellas deben ser manualmente agitadas y reubicadas en la incubadora.

Cálculos y ajustes

- a) Las lecturas obtenidas de las lecturas de producción de gas deben ser transformadas de psi a ml, en la en la tercer salida de la válvula acoplada al transductor puede insertarse una jeringa para sustraer volumen hasta que el transductor de presión marque 0 y deben anotarse los dos valores (psi y ml) para establecer una ecuación de regresión entre la relación que existe entre el volumen (ml) y la presión del gas (psi). (esto puede hacerse solo en una corrida y la ecuación puede ser utilizada para trabajos posteriores en el mismo laboratorio).
- b) La regresión lineal para transformar los datos de psi (X) a ml (Y) establecida en el laboratorio de bromatología del Centro Universitario UAEM Temascaltepec es la siguiente:

$$Y = 0.024 + 5.34X + 0.031X^2$$

- c) Los datos de la acumulación de la producción de gas en los diferentes tiempos son utilizados para calcular los parámetros de la fermentación ruminal [fase lag (L , h), asintótica de producción de gas (B , ml g⁻¹ DM), y tasa fraccional de producción de gas (k , /h),] mediante regresión no lineal utilizando alguno de los siguientes modelos matemáticos:

$$G = B[1 - e^{-ct}]$$

$$G = B[1 - e^{-c(t-L)}]$$

$$G = B[1 - e^{-b(t-L) - c(\sqrt{t-L})}]$$

- d) Pueden también calcularse la energía metabolizable (EM, MJ kg⁻¹ de MS) y la concentración de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, mmol) usando las siguientes formulas:

$$ME = 2.20 + 0.136IVGP_{24}(ml/0.5 g DM) + 0.57CP(\% DM)$$

$$SCFA = -0.00425 + 0.0222 (ml gas at 24 h)$$

Determinación de la desaparición de la materia seca y orgánica

- a) La desaparición de la materia seca se calcula mediante la recuperación de la fracción no degradada al final de la corrida de producción de gas, cada una de las botellas debe ser filtrada al vacío a través de crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 a 160- μm tamaño de poro) previamente pesados. Las botellas deben ser lavadas con agua caliente para eliminar la mayoría de los residuos del interior de la botella, los crisoles deben secarse a 100°C durante 24 h. cumplido el tiempo de secado se debe dejar enfriar los crisoles en un desecador durante 5 minutos y pesar.
- b) Una vez pesados los crisoles el residuo de la incubación puede ser incinerado a 500°C por 6 h si se desea calcular la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica.
- c) La degradabilidad de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) es expresada como porcentaje.

$$DIVMS (\%) = \left[\frac{\text{peso de la muestra (g)} - [\text{peso residuo (g)} - \text{peso del blanco (g)}]}{\text{peso de la muestra (g)}} \right] \times 100$$

$$DIVMO (\%) = \left[\frac{MO \text{ muestra (g)} - [MO \text{ residuo (g)} - MO \text{ blanco (g)}]}{MO \text{ muestra (g)}} \right] \times 100$$

Resultados

En la Tabla 1 se observa la composición nutricional del salvado de maíz; estos resultados coinciden con los encontrados por Bartolo-Pérez et al. (1999), a partir de este perfil nutricional se considera que una parte de la proteína de las raciones para la alimentación de ovinos puede ser reemplazada por salvado de maíz.

Tabla 1. Análisis proximal del salvado de maíz.

	<i>Salvado de Maíz</i>		
	Base Húmeda	Base Seca	Base Tal Como se Ofrece
Humedad (H) %	7.99	0	7.99
Materia Seca (MS)	92.01	100	92.01
Cenizas %	5	5	5
Materia Orgánica (MO), %	87	94.56	87
Proteína Cruda (PC) %	18.78	20.41	18.78
Extracto Etéreo (EE) %	1.23	1.33	1.23
Fibra Cruda (FC) %	9.69	10.53	9.69
Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) %	57.31	62.29	57.31
Total	100	100	100

Laboratorio de bromatología Dpto. Zootecnia UACH.

La producción de gas en los diferentes tiempos de fermentación in vitro presentó diferencias que fueron estadísticamente significativas, los periodos 2-6 h, 6-8 h, 8-12 h, 12-14 h, 24-36 h, y 48 h, presentaron diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$) en la producción de gas (Tabla 2, Figura 2 y 3).

Tabla 2. Producción de gas in vitro del salvado de maíz.

Tiempo (h)	Gas	Intervalo confianza, (95%)			
2	36.58 ^g	24.87	54.28	EEM	7.31
4	51.60 ^g	36.89	66.37	CV, %	13.45
6	71.09 ^{fg}	56.38	85.79	R ²	0.957
8	89.81 ^{ef}	75.1	104.5	EFECTO L	<0.0001
10	110.49 ^{de}	95.79	125.19	EFECTO Q	<0.0001
12	125.40 ^d	110.7	140.1	CORRELACION	0.968
14	134.40 ^d	119.69	149.09	TIEMPO/PROD GAS	(<0.0001)
24	182.78 ^c	167.57	196.97		
36	229.33 ^b	214.63	244.03		
48	298.39 ^a	283.69	313.09		

Figura 2. Producción de gas (ml de gas/ g MS)

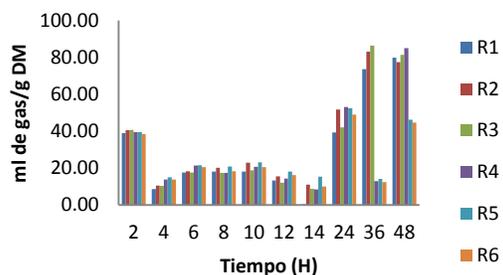
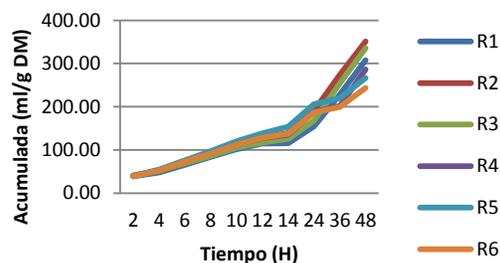


Figura 3. Producción acumulada de gas (ml/g MS)



En la Tabla 3 se pueden ver valores comparativos del salvado de maíz (*Zea mays*), cascarilla de soya (*Glycine max*) y pasta de higuera (*Ricinus communis*). Se observa que el salvado de maíz mostro mayor ($P < 0.05$) producción de gas que cascarilla de soya y pasta de higuera. Además, La degradación de la MS fue mayor ($P < 0.05$) que las pasta de higuera.

Tabla 3. Producción de gas *in vitro* (ml gas/g MS), pH y degradabilidad de la MS de salvado de maíz, cascarilla de soya y pasta de higuera.

TIEMPO	TRATAMIENTO			EEM	P≤	% CV	R ²	Efecto	
	Salvado de maíz	Cascarilla de soya	Pasta de higuera					L	Q
2	39.56 ^a	35.43 ^{ab}	32.07 ^b	1.54	0.0133	10.55	0.468	0.077	0.012
4	51.60 ^a	46.23 ^a	39.16 ^b	1.88	0.0013	10.09	0.623	0.0627	0.0008
6	71.09 ^a	56.34 ^b	44.65 ^c	2.03	0.0001	8.68	0.864	0.0002	<0.0001
8	89.80 ^a	65.82 ^b	46.98 ^c	2.21	<0.0001	8.02	0.932	<0.0001	<0.0001
10	110.49 ^a	77.69 ^b	48.27 ^c	2.67	<0.0001	8.30	0.951	<0.0001	<0.0001
12	125.40 ^a	87.59 ^b	50.05 ^c	2.98	<0.0001	8.34	0.958	<0.0001	<0.0001
14	134.39 ^a	93.49 ^b	50.34 ^c	3.86	<0.0001	10.22	0.944	<0.0001	<0.0001
24	182.28 ^a	119.40 ^b	50.61 ^c	4.80	<0.0001	10.02	0.964	<0.0001	<0.0001
36	229.33 ^a	169.27 ^b	60.45 ^c	9.76	<0.0001	15.62	0.917	0.0007	<0.0001
48	298.39 ^a	243.00 ^b	71.50 ^c	10.05	<0.0001	12.05	0.953	0.0016	<0.0001
pH	6.66 ^a	6.71 ^a	7.40 ^b	0.087	<0.0001	3.09	0.747	0.7211	<0.0001
% DEG MS	83.61 ^a	75.96 ^a	38.09 ^b	3.70	<0.0001	13.76	0.852	0.1649	<0.0001

Medias con distinta literal en la misma hilera, son diferentes (P<0.05).

EEM=Error estándar de la media; P≤=Probabilidad;% CV=coeficiente de variación (%); R²=Coeficiente de determinación; L=Efecto lineal; Q=Efecto cuadrático.

Conclusiones

- Los resultados del análisis proximal coinciden con los reportados por (Bartolo-Pérez et al., 1999)
- La PG presenta diferencias significativas entre los periodos de incubación 0-10 h, 12-14 h, 24-36 h y 48h
- Esta información podría ser útil para buscar la compatibilidad de las curvas de fermentación entre los ingredientes que componen una ración
- El porcentaje de degradabilidad del Salvado de maíz fue de 86% en base seca.
- El salvado de maíz fue superior en producción de gas y degradación de la MS, lo cual lo hace un ingrediente prometedor para incluirse en dietas para ovinos.

Literatura Citada

Bartolo-Pérez, P, Peña, J.L., Cruz-Orea, A., Calderón A., 1999, Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX, Sociedad Mexicana de Ciencias de Superficies y de Vacío, 8, 64-68.

Brown, V.E., Rymer, C., Agnew, R.E., Givens, D.I., 2002. Relationship between in vitro gas production profiles of forages and in vivo rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. Anim. Feed Sci. Technol. 98, 13 – 24.

Blümemel, M., Ørskov, E.R., 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag roughages in predicting feed intake in cattle, Anim Feed. Sci. Technol. 40, 109 – 119.

Craig, W.M., Brown, D.R., Broderick, G.A., Ricker, D.B., 1987. Post-prandial compositional changes of fluid and particle-associated ruminal microorganisms. J. Anim. Sci. 65, 1042–1048

DePeters, E.J., Getachew, G., Fadel, J.G., Corona, L., Zinn, R.A., 2007. Influence of corn hybrid, protease and methods of processing on in vitro gas production. Anim. Feed Sci. Technol. 135, 157–175.

Financiera Rural, 2011, Monografía de los Subproductos de la Molienda de Maíz, Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMa%C3%ADzSubprod\(nov2011\)vf.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMa%C3%ADzSubprod(nov2011)vf.pdf)

Getachew G., Robinson P.H., DePeters E.J., Taylor S.J., 2004, Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds, Anim. Feed Sci. Technol, 111, 57 – 71.

Getachew, G., Crovetto G.M., Fondevila M., Krishnamoorthy U., Singh B., Spanghero M., Steingass H., Robinson P.H., Kailas M.M., 2002, Laboratory

variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 102, 169–180.

Getachew, G., Robinson P.H, DePeters, E.J Taylor S.J., 2003, Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 111, 57-71

Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 261–281.

Opatpatanakit,Y.,Kellaway, R.C., Lean, I.J., Annison, G., Kirby, A., 1994. Microbial fermentation of cereal grains in vitro. *Aust. J. Agric. Res.* 45, 1247–1263.

Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28, 7–55.

Ives, C.S., Sergio L.S, Sarita P. G, Helder L., Dorinha M.S.S., Adibe L., 2005, Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 95–105

López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J., Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 135, 139–156.