

**EFICIENCIA DE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE LOS TRACTOS  
GASTROINTESTINALES DEL MONOGÁSTRICO Y DEL RUMIANTE**

**DIANA MARÍA ÁLVAREZ NIVIA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS  
SEDE PALMIRA**

**2009**

**EFICIENCIA DE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE LOS TRACTOS  
GASTROINTESTINALES DEL MONOGÁSTRICO Y DEL RUMIANTE.**

**DIANA MARÍA ÁLVAREZ NIVIA**

**Tesis de Grado presentada como requisito para optar el título de Magíster en  
Ciencias Agrarias con énfasis en Producción Animal Tropical**

**DIRIGIDO POR:**

**Zoot. PhD. LUZ ESTELLA MUÑOZ ARBOLEDA,**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS  
SEDE PALMIRA**

**2009**

El consejo de Facultad y los jurados de Tesis de Maestría, no son responsables de las ideas emitidas por él o los autores del mismo.

(Artículo 24, Resolución 04-95)

A mis dos Angelitos  
Que adoro con el corazón  
SARA ISABEL y JUAN ANDRES

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que colaboraron en la realización de este trabajo de maestría y en especial a:

Luz Stella Muñoz Arboleda, Zootecnista, PhD. y Directora de la investigación, por sus consejos, orientación, apoyo y dedicación durante todo este proceso.

Fernando Estrada, Laboratorista, por permitirme el acceso al laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, y su ayuda durante las pruebas y análisis.

Carlos Vicente Durán, Ingeniero Agrónomo, por su apoyo y las facilidades brindadas para la realización de la presentación de este trabajo de investigación.

Guillermo Duque Nivia, Biólogo Marino, M.Sc, .PhD. Por su colaboración y apoyo en la parte estadística de esta investigación.

Andrés Mauricio Posso T. Funcionario del Laboratorio de Biología Molecular por su valiosa colaboración en la centrifugación de las muestras.

Johannes Delgado Auxiliar del Laboratorio de Fitoquímica por la colaboración en el proceso de liofilización de las muestras.

Julio Castro, Zootecnista, y los operarios de la unidad de Cerdos de la Granja Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su colaboración y apoyo durante este trabajo de tesis.

Patricia Ávila, Zootecnista, M.Sc. Directora del Laboratorio de Calidad de Forrajes y Nutrición de Rumiantes del Centro Internacional de Agricultura tropical CIAT, por su colaboración y ayuda en la realización de las pruebas de AGV.

La Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su formación académica tanto en pregrado como posgrado.

Mis padres Aura María y Camilo, mis hermanas Ángela María y María Camila, mi esposo David y mis hijos Sara Isabel y Juan Andrés por la compañía, la ayuda, el ánimo, el apoyo y el amor que siempre me brindan y me hacen tener ganas de seguir adelante en todos los pasos de mi vida.

Dios, porque es parte fundamental y ese ser supremo en el cual creo y me dio la vida y con ella momentos inigualables.

Todas y cada una de las personas que de una u otra manera colaboraron en el transcurso de este trabajo de tesis y que en este momento no me llegan a la mente.

## CONTENIDO

pág.

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>16</b>
<b>1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>18</b>
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>2. MARCO DE REFERENCIA .....</b>	<b>19</b>
2.1 DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> .....	19
2.1.1 TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS .....	21
2.1.2 MÉTODO DE MENKE .....	29
2.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PRODUCCION DE GAS EN EL MONOGÁSTRICO Y EL RUMIANTE.....	30
2.3 APOORTE O PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV) EN EL RUMIANTE Y EL MONOGÁSTRICO.....	33
2.3.1 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES PRIMARIOS.....	34
2.3.2 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES MENORES .....	34
2.3.3 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES.....	34
2.4 ESPECIES FORRAJERAS EMPLEADAS .....	44
2.4.1 MORERA ( <i>MORUS ALBA</i> ) .....	44
2.4.2 MAÍZ ( <i>ZEA MAYS</i> ) .....	48
2.4.3 TORTA DE SOYA ( <i>GLICINE MAX</i> ).....	52
<b>3. MODELO METODOLÓGICO .....</b>	<b>54</b>
3.1 LOCALIZACION .....	54
3.2 MATERIAS PRIMAS.....	54
3.3 INOCULOS.....	56
3.3.1 RUMIANTES .....	56
3.3.2 MONOGÁSTRICOS .....	56

3.4 TRATAMIENTOS .....	58
3.5 INSUMOS.....	59
3.5.1 DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA IN VITRO EN CERDOS .....	59
3.5.2 PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS, MONOGÁSTRICOS VS RUMIANTES....	61
3.5.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE NEUTRA .....	62
3.5.4 MEDICIÓN ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES .....	63
3.6 METODOLOGIA.....	64
3.6.1 DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA IN VITRO EN CERDOS.....	64
3.6.2 PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS, MONOGÁSTRICOS VS RUMIANTES....	69
3.6.3. DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN).....	78
3.6.4. PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV). .....	81
3.7 CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	85
3.7.1 DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA IN VITRO MONOGÁSTRICOS VS RUMIANTES.....	85
3.7.2 PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS.....	85
3.7.3 PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE NEUTRA .....	87
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>89</b>
4.1. MONOGÁSTRICOS .....	89
4.1.1 DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA IN VITRO .....	89
4.1.2. PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS.....	92
4.2 RUMIANTES .....	107
4.2.1 PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS.....	107
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>139</b>



## LISTA DE TABLAS

	pág.
TABLA 1: MATERIAS PRIMAS EVALUADAS. TRATAMIENTOS .....	55
TABLA 2: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS EVALUADAS .....	56
TABLA 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA (%) DEL MAÍZ .....	57
TABLA 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA (%) DE LA TORTA DE SOYA .....	58
TABLA 5. TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO. ....	59
TABLA 6. TRATAMIENTOS CON PREDIGESTIÓN (CP) Y SIN PREDIGESTIÓN (SP) CON INOCULO DE CERDOS.....	71
TABLA 7. TRATAMIENTOS CON PREDIGESTIÓN (CP) Y SIN PREDIGESTIÓN (SP) CON LÍQUIDO RUMINAL (BOVINO) .....	72
TABLA 8. DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA DE MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA .....	89
TABLA 9. PRODUCCIÓN TOTAL DE GAS <i>IN VITRO</i> PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON SUS INTERACCIONES (CP Y SP) EN CERDOS.....	95
TABLA 10. PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES AGV PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON SUS INTERACCIONES (CP Y SP) EN CERDOS. ....	98
TABLA 11. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA Y PERFIL DE AGV PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA, CON PREDIGESTIÓN (CP) Y SIN PREDIGESTIÓN (SP) EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL CERDO. ....	99
TABLA 12. DEGRADACIÓN DE FDN PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON SUS INTERACCIONES (CP Y SP) EN CERDOS. ....	104
TABLA 13. PRODUCCIÓN DE GAS PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON SUS INTERACCIONES (CP Y SP) EN BOVINOS.....	112
TABLA 14. PRODUCCIÓN DE AGV PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON PREDIGESTIÓN Y SIN PREDIGESTIÓN EN BOVINOS.....	115
TABLA 15. PRODUCCIÓN Y PERFIL DE AGV PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA, CON PREDIGESTIÓN (CP) Y SIN PREDIGESTIÓN (SP) A NIVEL RUMINAL.....	116
TABLA 16. DEGRADACIÓN DE FDN PARA MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON PREDIGESTIÓN Y SIN PREDIGESTIÓN EN BOVINOS.....	120

## LISTA DE GRAFICOS

PÁG.

GRÁFICA 1. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO EN EL INTESTINO GRUESO DEL CERDO CON LAS MATERIAS PRIMAS MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON PREDIGESTIÓN Y SIN PREDIGESTIÓN.....	92
GRÁFICA 2. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO DE MORERA, MAÍZ Y TORTA DE SOYA CON PREDIGESTIÓN Y SIN PREDIGESTIÓN PARA BOVINOS.....	108

## LISTA DE CUADROS

pág.

CUADRO 1: APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS EN EL MONOGÁSTRICO Y EL RUMIANTE. DIFERENCIAS DE LOS TRACTOS GASTROINTESTINALES. ....	31
CUADRO 2: PROPORCIÓN MOLAR PROMEDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN FORRAJES Y CONCENTRADOS. ....	36
CUADRO 3. INSUMOS PARA LA PRUEBA DE PREDIGESTIÓN .....	60
CUADRO 4. INSUMOS PARA LA PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO.....	61
CUADRO 5. INSUMOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA FDN .....	62
CUADRO 6. INSUMOS UTILIZADOS EN LA MEDICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES.....	63

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1. TRACTOS DIGESTIVOS DEL CERDO Y DEL BOVINO. DIFERENCIAS.....	33
FIGURA 2. BAÑO MARÍA CON LOS ERLLENMEYERS EN EL INTERIOR. ....	67
FIGURA 3. FILTRACIÓN (TELA DE NYLON). ....	68
FIGURA 5: PARTES DE UNA JERINGA UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRUEBA DE FERMENTACIÓN. ....	73
FIGURA 6: INCUBACIÓN DE LAS JERINGAS EN EL BAÑO MARÍA A 39°C.....	76
FIGURA 7: DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN JERINGAS MONOGÁSTRICOS VS RUMIANTES.....	78
FIGURA 8: NÚMERO DE MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FDN.....	79
FIGURA 9: DIGESTOR PARA FIBRAS GERHARDT EN LA DIGESTIÓN DEL CONTENIDO DE LAS JERINGAS CON SOLUCIÓN DETERGENTE NEUTRA. ....	80
FIGURA 10: DIAGRAMA DE FLUJO DE LA DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE NEUTRA. .....	81
FIGURA 11: TOMA DE LA MUESTRA DE AGV.....	83
FIGURA 12: DIAGRAMA DE FLUJO DE LA DETERMINACIÓN DE AGV.....	84

## LISTA DE ANEXOS

pág.

ANEXO A. MÉTODO DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE BOISEN Y FERNÁNDEZ, (1997) ...139

## RESUMEN

El proyecto de tesis EFICIENCIA DE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE LOS TRACTOS GASTROINTESTINALES DEL MONOGÁSTRICO Y DEL RUMIANTE tiene como fin determinar a través de una técnica de laboratorio el potencial de tres (3) materias primas, Morera (*Morus alba*), Maíz (*Zea mays*) y Torta de Soya (*Glicine max*) comparativamente en los tractos gastrointestinales del monogástrico y el rumiante, determinando su digestibilidad enzimática, la cinética de producción de gas, la degradación de Fibra Detergente Neutra (FDN) y la producción total y el perfil de Ácidos Grasos Volátiles AGV. Las materias primas se incubaron en los tractos digestivos de cerdos y bovinos *in vitro* con interacciones entre ellas, materias primas Con Predigestión (CP) y materias primas Sin Predigestión (SP), teniendo en cuenta que los animales Monogástricos predigieren sus alimentos y los animales rumiantes no lo hacen. La materia prima que obtuvo los valores más altos de digestibilidad fue Torta de Soya (82.72%) y la de mas baja digestibilidad Morera (47.09%), siendo esta también la de mas baja producción de gas tanto CP como SP para monogástricos y rumiantes. Morera SP presentó la mayor producción de AGV (78.35mm/litro) para monogástricos, y Torta de Soya SP la mayor producción de AGV (77.78mm/litro) para rumiantes. Morera SP en cerdos fue la materia prima que presentó mayores porcentajes de degradación de FDN (88.84%) y Morera CP obtuvo la mayor degradación de FDN (91.76%) en rumiantes. El factor CP y SP afecto notablemente la materia prima.

**Palabras Claves:** Digestibilidad Enzimática, Producción de Gas, AGV, FDN, *Morus Alba*, *Zea mays*, *Glicine max*, monogástricos, rumiantes.

## SUMMARY

The project EFFICIENCY OF THE FERMENTATION IN VITRO OF GASTROINTESTINAL TRACT OF MONOGASTRIC AND RUMINANTS aims to determine through a laboratory technique the potential of three (3) raw materials, Mulberry (*Morus alba*), Corn (*Zea mays*) and Soybean Cake (*Glycine max*) compared in the gastrointestinal tract of monogastric and ruminants, determining its enzymatic digestibility, kinetics of gas production, the degradation of neutral detergent fiber (NDF) and total production and profile of Volatile Fatty Acids (VFA). The raw materials were incubated in the digestive tracts of pigs and cattle *in vitro* interactions between them, raw materials with Predigestion (CP) and raw materials without Predigestion (SP), given that their food predigest monogastric animals and ruminants do not. The raw material obtained the highest values of digestibility was soybean cake (82.72%) and the lowest digestibility of mulberry (47.09%), and this is also the lowest gas production for both CP and SP in monogastric and ruminants. Mulberry SP had the highest production of VFA (78.35mm/litro) for monogastric and Soybean Cake SP increased production of VFA (77.78mm/litro) for ruminants. Mulberry SP in pigs was the raw material had higher rates of degradation of NDF (88.84%) and Mulberry CP had the highest degradation of NDF (91.76%) in ruminants. The CP and SP factor affect the raw material. Significantly.

**Keywords:** Enzymatic Digestibility, Gas Production, VFA, NDF, *Morus alba*, *Zea mays*, *Glycine max*, monogástrico, ruminants.

## INTRODUCCION

La medida de producción de gas utilizando la prueba de fermentación en jeringas implementada por Boudry *et al.* (2003) y modificada del protocolo descrito por Menke y Steingass (1988), es un método que tiene la ventaja de evaluar un gran número de sustratos para ser fermentados por un determinado tiempo, lo cual es ideal para estudios comparativos, igualmente genera datos de cinética de digestión midiendo la fermentación del alimento en lugar de su desaparición. Esta técnica suministra una información muy detallada sobre la dinámica de fermentación de diferentes materias primas utilizadas en alimentación animal y presenta un mejor monitoreo de algunas interacciones como la de nutriente – antinutriente lo cual hace que esta técnica se base en la cuantificación del sustrato degradado o la producción de proteína microbiana usando marcadores internos o externos y la producción de gases o Ácidos Grasos Volátiles. Esta técnica es susceptible a los efectos de factores antinutritivos y sensibles a las interacciones entre los alimentos, los cuales no pueden ser medidos con otras técnicas.

Entre algunas de las materias primas mas utilizadas en nuestro país para la alimentación de los animales se encuentran Maíz (*Zea mays*) y Torta de Soya (*Glicine max*) las cuales tienen un alto valor nutritivo

Igualmente, forrajes como Morera (*Morus alba*) representan un papel muy importante en la producción y mejoramiento de la calidad de la alimentación de los animales tanto rumiantes como cerdos y sirven para disminuir la utilización de alimentos concentrados los cuales representan un alto porcentaje (70%) de los costos totales de producción de los pequeños y grandes productores de Colombia. Actualmente, se tiene la gran responsabilidad de seguir estudiando estas materias



primas y predecir sus valores nutritivos de manera rápida, segura y lo mas confiable posible.

En rumiantes existen numerosos trabajos de investigación tanto *in vivo* como *in vitro* que han aportado bastante información sobre la eficiencia de fermentación ruminal. Por el contrario hay poca información sobre la eficiencia de la fermentación del tracto digestivo de los monogástricos para poder determinar el valor potencial de las materias primas que consume. Por lo tanto, se hace necesario explorar más acerca de este tema e identificar un poco las diferencias entre el tracto digestivo de los monogástricos y los rumiantes.

El objetivo principal de esta investigación fue desarrollar de manera *in vitro* comparaciones de la eficiencia de fermentación en los tractos digestivos de los monogástricos y los rumiantes basadas en la combinación de materias primas como la morera, el maíz y la torta de soya.

El presente estudio fue aprobado y financiado por el Grupo de investigación en Nutrición Animal UNCP de la Universidad Nacional de Colombia. Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y en el Laboratorio de Nutrición de Rumiantes y Calidad de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

## 1. OBJETIVO GENERAL

Realizar comparaciones de la eficiencia de fermentación de los tractos digestivos de los monogástricos y los rumiantes utilizando pruebas de digestibilidad *in vitro*.

### 1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la digestibilidad enzimática *in vitro* del tracto gastrointestinal del cerdo.
- Comparar las cinéticas y las producciones de gas *in vitro* en el rumen del bovino y el intestino grueso del cerdo utilizando tres materias primas, Morera (*Morus alba*), Maíz (*Zea mays*) y Torta de Soya (*Glicine max*).
- Determinar y comparar la degradación de Fibra Detergente Neutra (FDN) en el rumen e intestino grueso del cerdo utilizando las tres materias primas.
- Medir la producción total y el perfil de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) *in vitro* generados a nivel de rumen e intestino delgado del cerdo utilizando tres materias primas, Morera (*Morus alba*), Maíz (*Zea mays*) y Torta de Soya (*Glicine max*).

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

La digestibilidad *in vitro* de los alimentos o materias primas puede ser estudiada mediante análisis a nivel de laboratorio los cuales simulan el proceso de digestión. Estos métodos *in vitro* utilizados para obtener valores de digestibilidad deben tener la característica de ser menos costosos que los métodos *in vivo*, ser fáciles de desarrollar en un tiempo menor, con respuestas eficaces y con condiciones experimentales mas exactas (Makkar, 2003).

Las digestiones *in vitro* por lo general no pueden simular en forma precisa los detalles de una digestión *in vivo*, por lo que cambios que se hagan en las condiciones de incubación *in vitro* pueden alterar las relaciones entre estos dos métodos, en particular para alimentos con composiciones desbalanceadas.

Las pruebas de digestibilidad *in vitro* han sido desarrolladas desde los años sesenta y aunque se encuentran muchos métodos de digestibilidad, las cuatro mayores técnicas hasta hoy utilizadas por los nutricionistas son la de Tilley y Terry, (1963), el método de Menke *et al.* (1979), método de producción de gas de Theodorou *et al.* (1994), y el método de digestibilidad *in situ* en bolsas de nylon de Mehrez y Orskov (1977). Todos estos procedimientos simulan la digestibilidad del tracto digestivo de los rumiantes, con periodos de incubación similares y utilizando como inóculo líquido ruminal.

En cuanto a las técnicas *in vitro* en monogástricos, se ha aplicado a herbívoros no rumiantes como caballos y conejos y existen pocos estudios en cerdos. La mayoría de estos estudios nos muestran resultados de fermentación microbiana de alimentos naturales, sin embargo si vemos lo que sucede en el colon al final del tracto digestivo se reduce la exactitud de esta aproximación ya que importantes transformaciones digestivas ocurren en los alimentos antes de que estos lleguen al intestino grueso. Por esto Fondevila *et al.* (2002) dice que se debe utilizar el material que actualmente llega al colon como sustrato para la fermentación ya que es mas preciso en la medición de gas.

Para la aplicación de la técnica de producción de gas en monogástricos es indispensable considerar la fermentación microbiana en el colon de las dietas para cerdos, y las características que separan este proceso del que ocurre en el rumen.

Boisen y Fernandez (1997), describieron un método *in vitro* que predice la digestibilidad total en el tracto digestivo de la energía de toda clase de alimentos y dietas para estos animales, teniendo en cuenta que la digesta que llega al intestino grueso de los cerdos se modifica en previos sitios digestivos e incluye secreciones endógenas y células muertas. Para las evaluaciones de la fermentación microbiana se hace más conveniente usar sustratos que provengan directamente del ciego y no de dietas modificadas (Fondevile *et al.*, 2002).

El método descrito por Boisen y Fernandez (1997), ha sido estandarizado para que el potencial máximo de digestibilidad de las fracciones de nutrientes sea medido independientemente de su concentración en el alimento (Ver anexo A).

Este método debido al complejo proceso de fermentación que se da en el intestino grueso del tracto digestivo de los monogástricos el cual no puede ser reemplazado por una mezcla de enzimas, hace que esta practica no haya sido desarrollada por otros investigadores.

**2.1.1 Técnica de producción de gas.** Las técnicas de producción de gas son de mucho interés en la valoración de los animales por su habilidad para evaluar las dinámicas de digestión y su potencial para simular los procesos de digestión en el rumen. (Alvarez, 2000).

La técnica de producción de gas *in vitro* caracteriza los alimentos por su cantidad digestible de carbohidratos y por la tasa a la cual estos nutrientes son liberados. Por lo tanto este sistema hace útil evaluar rutinariamente los forrajes porque produce resultados con alta precisión y repetibilidad (Getachew *et al.* 1998)

Recientemente, las técnicas de producción de gas han sido de mucho interés y se ha incrementado su utilización gracias a la facilidad y utilidad de datos sobre la cinética de la digestión tanto de las fracciones solubles como las insolubles en dietas basadas en forrajes (Getachew *et al.*, 1998; citado por Ruiz, 2005).

La técnica de producción de gas *in vitro* es utilizada para evaluar el valor nutricional de los alimentos y para obtener un mejor conocimiento de los procesos de fermentación que ocurren frecuentemente en el rumen, ya que la esencia de esta técnica es simular la fermentación de éste.

Tres aproximaciones para medir la producción de gas han sido usadas: 1) medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, 2) medir la presión de gas a un volumen fijo, y 3) medir el número de incrementos de volumen requeridos para causar un pequeño cambio definido en la presión, una combinación de los métodos 1 y 2. La elección del método para medir la producción de gas depende del supuesto que los excesos de presión acumulada afectan el crecimiento microbiano (Schofield y Pell 1995) y generan cambios en la solubilidad de los gases en el medio, lo cual puede generar errores en las mediciones (Getachew *et al.* 1998)

Los perfiles de producción de gas reflejan un enlace de procesos de fermentación los cuales a través de la incubación empiezan a su máxima proporción y declinan posteriormente. Esto permite que se separen los procesos que difieren en su proporción de máxima fermentación y en el tiempo en el cual su proporción máxima es alcanzada (Groot *et al.*, 1996).

Los perfiles de producción de gas podrían estar divididos en tres fases:

1. representando la producción de gas que viene de la fermentación de la fracción soluble en agua, 2. la fracción no soluble, y 3. Cambio microbial (Cone *et al.*, 1997; citado por Cone *et al.*, 2002). Sin embargo, las características de las diferentes fases de un perfil pueden ser deducidas a partir de cambios en la medición de la proporción de la fermentación (Groot *et al.* 1996).

La producción de gas presenta un periodo de latencia en su primera parte en la cual no hay producción de gas y es aquí donde se da la capacidad de digestión del alimento gracias a los microorganismos presentes en el inóculo. El periodo de latencia tiene una duración que varía según el método de laboratorio usado.

Aiple *et al.* (1992), demostraron que la concentración del inóculo afecta también la producción de gas ya que en disoluciones mayores a 10 X los microorganismos que se encuentran concentrados en la muestra son bajos y esto permite que haya una mayor concentración de ellos.

La especie animal, la dieta y el inóculo también tienen una influencia fuerte en la producción de gas *in vitro*. Martínez *at al.* (2005), Evaluaron la influencia de los donantes de los animales durante la aplicación de la técnica de producción de gas *in vitro* con el uso de las heces de las especies bovina anulada utilizando como follaje *Leucaena leucocephala*, encontrando que los resultados de la prueba *in vitro* de gas, con heces frescas como inóculo, tienen un nivel aceptable de reproducibilidad cuando el inóculo viene del mismo animal, pero varían considerablemente cuando las heces son de animales diferentes.

La técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos de digestibilidad usan sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal (Williams 2000).

El contenido y la naturaleza de varios constituyentes del alimento y por consiguiente, la cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato. La mayoría de los grupos hacen

secado por congelación o en el horno a baja temperatura (60 o 70°C) (Williams 2000; Rosero 2002).

Un menor tamaño de partícula aumenta el área de superficie para la degradación microbiana. Para el análisis de producción de gas, la mayoría de los autores muelen los sustratos a través de una malla de 1 mm (Williams 2000).

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0.1g a 1g (Williams 2000). Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón (Getachew *et al* 1998).

Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurina como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO<sub>2</sub> es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Williams 2000). Grant y Mertens (1992) indican que el gaseo continuo con CO<sub>2</sub> y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN.

El fluido ruminal tomado después del ayuno es menos activo que el recolectado dos horas después de alimentar, pero es más consistente en su composición y actividad. Como regla general, se recomienda colectar el inóculo antes de la alimentación y por lo menos de tres animales consumiendo la misma dieta.



(Williams 2000). La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferente producción de gas si el fluido ruminal es tomado en diferentes días, situación que deberá corregirse por la introducción de estándares de conocida producción de gas (Getachew *et al* 1998).

El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos se hace mayor (Pell y Schofield 1993). El procedimiento de licuado puede también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO<sub>2</sub> no es suficientemente fuerte (Williams 2000).

Estudios *in vitro* describen que un medio conteniendo 20% a 25% de fluido ruminal da los mejores resultados (Schofield 2000). Sin embargo, la cantidad de inóculo adicionado varía ampliamente entre grupos (Williams 2000). Algunas proporciones líquido ruminal:tampón son 1:2 (Cone *et al* 1996; Menke y Steingass 1998); 1:4 (Pell y Schofield 1993), 1:9 (Theodorou *et al* 1994; Mauricio *et al* 1999).

Una serie de botellas o jeringas blanco conteniendo medio e inóculo pero no sustrato, es rutinariamente incluida en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13%-27% de la lectura final, es substraído desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato.(Pell y Schofield 1993; Schofield 2000)

Al igual que los blancos, los estándares son corridas en cada experimento. Cada estándar tiene una producción de gas conocida, determinada por promedio de muchas réplicas. Si el estándar incluido dentro de una corrida produce entre el 90 y el 110% del gas con respecto al valor promedio, entonces el fluido ruminal es calificado como normal y todas las medidas de volumen de gas son corregidas por el factor "promedio del volumen estándar/volumen estándar de la corrida". Si, por el contrario, el volumen estándar de la corrida está situado por fuera de este rango, el dato de la corrida es desechado (Schofield 2000).

El emplear la técnica de producción de gas *in vitro* como herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes asume que el gas producido durante la fermentación es proporcional a la materia seca digerida y la digestión de los alimentos implica la fermentación de distintas fracciones a lo largo del tiempo, y consecuentemente la relación Gas Producido: Sustrato Desaparecido podría cambiar a lo largo de la fermentación para un mismo alimento (Jaurena *et al.* 2006).

La liberación de gas de un alimento incubado *in vitro* con inóculo ruminal está relacionada con la digestibilidad y por lo tanto con el valor energético de los alimentos (Menke y Steingass, 1988).

Según Menke y Steingass, (1988), y Getachew *et al.* (1998), los coeficientes de la producción de gas parecen afectarse por la variación en la digestibilidad de las grasas crudas y de la descomposición de la proteína y por la actividad microbiana del inóculo respectivamente. Por lo tanto, una pobre digestibilidad de las grasas crudas se ve asociada con una poca digestibilidad de los carbohidratos y viceversa.

Pendong *et al.* (1996), mostraron que la técnica de producción de gas de Theodorou *et al.* (1994) usando forrajes templados (moderados, benignos) podría usarse para evaluar o determinar la desaparición de materia orgánica (MO) digestible, así como las dinámicas de fermentación.

Se ha demostrado que la producción de gas está relacionada con la desaparición de FDN. Nsahlai *et al.* (1995) y al respecto Pell *et al.* (1997) encontraron que la relación entre ambos conceptos es lineal, con una pendiente marcadamente constante. Igualmente se ha encontrado una alta correlación entre la producción de gas *in vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de cereales (Opatpatanakit *et al.* 1994). Menke *et al.* (1979), encontraron que la producción de gas acumulada en 24 horas estuvo bien correlacionada con la digestibilidad de MO determinada *in vivo*. Finalmente, Sileshi *et al.* (1996) y López *et al.* (1998) han reportado significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de MS *in situ* y la tasa fraccional de producción de gas.

La técnica de producción de gas *in vitro* es en parte susceptible a los efectos de factores antinutritivos y es sensible a las interacciones entre forrajes difíciles de digerir y forrajes de árboles. Primero, los forrajes de árboles suministran proteína a los forrajes de suplemento que generalmente son deficientes en N, segundo, los carbohidratos altamente fermentables pueden estimular la fermentación de fibra menos fermentable, igualmente, la digestibilidad de los materiales vegetales en el rumen está relacionado con la lignificación y proporción de la pared celular de la planta; árboles forrajeros con bajos contenidos de Fibra Detergente Neutra (FDN) (20%-35%) presentan usualmente alta digestibilidad y especies con altos contenidos de lignina, son frecuentemente de baja digestibilidad (Alvarez, 2000).

Se ha encontrado que la digestibilidad de la materia seca (MS) por la bolsa de nylon en leguminosas arbóreas esta negativamente correlacionada con FDN, Fibra Ácida Detergente (FAD) y lignina y positivamente correlacionada con contenidos de nitrógeno y ceniza (Alvarez, 2000).

Aunque la técnica de producción de gas en algunas ocasiones se hace costosa, el procedimiento de medida de producción de gas basada en la presión obtenida del espacio libre (Theodorou *et al*, 1994), es un procedimiento simple *in vitro* que no requiere de jeringas o materiales muy costosos, como sí lo requieren otras técnicas de producción de gas, además, este procedimiento proporciona datos precisos de la fermentación del alimento en animales rumiantes y tiene la gran ventaja de habilitar substratos diferentes que pueden ser fermentados en un determinado tiempo, lo cual, lo hace propicio para realizar estudios comparativos (Alvarez. 2000).

Sin embargo en algunas ocasiones se hace un poco difícil conseguir el inóculo ruminal debido a que se necesitan animales fistulados y estos no son muy comunes entre las industrias y laboratorios, por lo tanto se recomienda para animales rumiantes trabajar con las heces fresca (Cone *et al*, 2000).

Con cerdos hay más facilidad porque la mayoría de las veces se trabaja con las heces frescas antes de caer al suelo. Tanto para el líquido ruminal, como para las heces de los animales hay que tener muy en cuenta la temperatura adecuada para su transporte (39°C), ya que si esto no es tenido en cuenta, los microorganismos presentes en ellas mueren y se perderían los inóculos.

**2.1.2 Método de Menke.** Menke *et al.* (1979) utilizando una técnica de producción de gas *in vitro* desarrollaron un sistema de evaluación de alimentos. Este sistema de evaluación utilizaba jeringas de vidrio de 100 ml para las fermentaciones con capacidades por jeringa de 200mg de muestra y con un inóculo de líquido ruminal. El tiempo de incubación era de 24 horas y se podía predecir la energía metabolizable de las materias primas estudiadas. Al utilizar la cantidad de 200mg de muestra el método era simple y se podían analizar un alto número de muestras simultáneamente, sin embargo este método no tenía la capacidad de colocar una mayor cantidad de muestra (> 500mg) en cada jeringa debido a que estas eran estrechas. Cuando se utilizaba 200mg de muestra no era necesario remover el gas que se iba produciendo, caso contrario a cuando se intentaba utilizar 500mg de muestra. Esto conllevaba a un fuente de error (Ruiz, 2005).

Debido a estos inconvenientes el método fue modificado por Blummel y Orskov (1993), citados por Ruiz (2005), los cuales en vez de utilizar un rotor en un incubadora como se hacia anteriormente, utilizaron un baño María termostáticamente controlado para incubar los alimentos, pero a pesar de esto la cantidad de muestra por jeringa seguía siendo 200mg, entonces Blummel *et al.* (1993) y Makkar *et al.* (1995), citados por Ruiz (2005), modificaron nuevamente el método y utilizaron la cantidad de muestra de 500mg e incrementaron la cantidad de solución buffer con líquido ruminal. Estas modificaciones tienen una gran ventaja sobre el método original las cuales se reflejan en una mínima variación de temperatura del medio durante el periodo de lectura de la producción de gas debido a la utilización de un baño María, lo cual es una ventaja cuando se estudia la cinética de fermentación de los alimentos en diferentes periodos de incubación (Ruiz, 2005). Igualmente, otra de las ventajas es la disminución de la fuente de error al determinar la digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad verdadera. Getachew *et al.* (1998).

## **2.2 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PRODUCCION DE GAS EN EL MONOGÁSTRICO Y EL RUMIANTE**

Debido a que no es tan común una técnica a nivel de laboratorio que permita identificar la eficiencia de la fermentación del tracto digestivo del cerdo para poder determinar el valor potencial de las materias primas que consume, se hace necesario explorar más acerca de este tema y ver un poco las diferencias entre el tracto digestivo de los monogástricos en este caso el cerdo y los rumiantes, en este caso el bovino.

El intestino grueso del cerdo no tiene protozoos ni hongos anaeróbicos que degraden la fibra, mientras que los rumiantes presentan protozoos que pueden degradar más de un tercio de la fibra en el rumen. Otra gran diferencia entre el intestino grueso y el rumen es la exposición a la bilis y sus productos metabólicos, por lo que los microorganismos se deben hacer resistentes a estos productos. También, en el tracto intestinal de los cerdos se encuentra una menor actividad metanogénica que en el rumen. La metanogénesis cuenta para una pérdida mínima de energía digestible en cerdos. Ruiz, (2005).

Sin embargo, y a pesar de estas diferencias entre los cerdos y los rumiantes, Argenzio y Stevens (1984), citados por Ruiz (2005), han demostrado según estudios realizados en una gran variedad de especies que el rumen y el intestino grueso de los mamíferos tienen algunas similitudes con respecto a la digestión microbial, secreción y absorción. (Cuadro 1)

**Cuadro 1:** Aplicación de la técnica de producción de gas en el monogástrico y el rumiante. Diferencias de los tractos gastrointestinales.

<b>RUMIANTES (RUMEN)</b>	<b>MONOGASTRICOS (INTESTINO GRUESO)</b>
Bacterias	Bacterias
Protozoos	-----
Hongos	-----
Proteína microbial (Síntesis y degradación)	Proteína microbial (Síntesis y degradación)
Producción y absorción de AGV	Producción y absorción de AGV

El rumen y el intestino grueso de los mamíferos presentan muchas similitudes en muchos aspectos. La proteína microbial en la digesta de ambos órganos es sintetizada y degradada de una forma similar. Los AGV los cuales resultan de la fermentación de los carbohidratos son producidos en concentraciones similares. El pH de la digesta se mantiene por el buffer adicionado por el fluido ileal o por la saliva. Los AGV son absorbidos a proporciones equivalentes por el epitelio del rumen y la mucosa del intestino grueso. En ciertos casos, la producción de AGV produce efectos adversos similares. Argenzio y Stevens, (1984); citados por Ruiz, (2005).

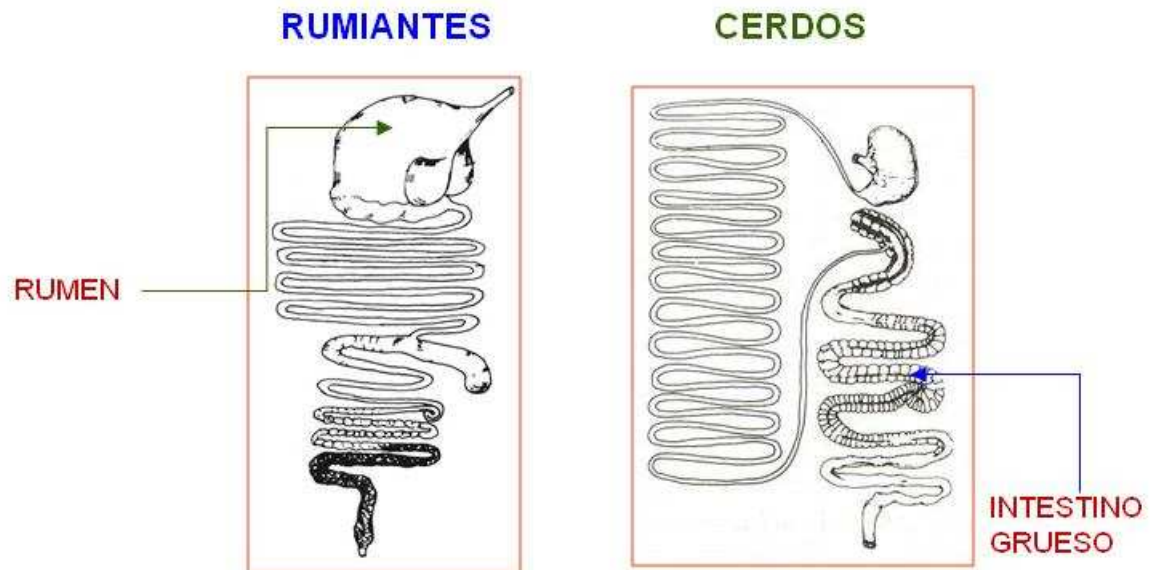
A pesar de todo, cuando se va a aplicar la técnica de producción de gas en la medición de la fermentación microbiana en el colon de dietas para cerdos se debe tener en cuenta las características que separan este proceso del que ocurre en el rumen. Entre estos procesos se encuentra el de la digesta, la cual llega al intestino grueso notablemente modificada en sitios digestivos previos y también incluyen células muertas y secreciones endógenas. (Figura 1).

La digestibilidad de fibras en el ciego es proporcional al tiempo de retención y el largo del intestino, así, cuerpos grandes digieren más eficazmente la fibra.

Una dieta completa y balanceada a base de almidón y maíz depositada por infusión en el ciego fue digerida muy bien, como si hubiera sido depositada vía oral. Esto demuestra la alta capacidad digestiva del ciego y el colon. Just *et al.* (1981).



**Figura 1.** Tractos digestivos del cerdo y del bovino. Diferencias.



### **2.3 APOORTE O PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV) EN EL RUMIANTE Y EL MONOGÁSTRICO**

Los Ácidos Grasos Volátiles constituyen los principales productos de la fermentación animal, principalmente de los hidratos de carbono. Estos se dividen en Ácidos Grasos Volátiles primarios y Ácidos Graos Volátiles menores. Lehninger, (1987).

**2.3.1 Ácidos Grasos Volátiles Primarios.** son el ácido acético, propiónico, y butírico. Con frecuencia los Ácidos Grasos Volátiles son denominados como sus iones disociados. Acetato, propionato y butirato.

**2.3.2 Ácidos Grasos Volátiles Menores.** estos Ácidos Grasos Volátiles son cuantitativamente menores pero metabólicamente importantes: valérico, isovalérico, isobutírico y el 2 metil butírico.

Los ácidos grasos producidos por acción microbiana son absorbidos directamente desde el rumen, retículo, omaso e intestino grueso. La absorción ruminal es rápida.

El epitelio ruminal tiene capacidad de metabolizar los ácidos grasos volátiles. Se cree que entre el 80% a 90 % el butirato es convertido en cuerpos cetónicos, hasta el 50% del propionato puede ser metabolizado a lactato y piruvato durante la absorción. Relativamente poco acetato es usado aparte cómo fuente energética, por el epitelio ruminal y músculo (Zarate, 2008).

### **2.3.3 Metabolismo de los Ácidos Grasos Volátiles.**

- **Carbohidratos.** Los carbohidratos presentes en la composición de los forrajes (follaje de las plantas) son prácticamente inutilizados por el hombre y la mayoría de las especies domésticas monogástricos, pero para los herbívoros representan el sustrato vital para la digestión fermentativa, debido a la capacidad de los microorganismos para degradarla.

Los carbohidratos de los alimentos pueden dividirse en dos grupos:

- **Carbohidratos solubles o extracto libre de nitrógeno.** agrupa a los monosacáridos (glucosa, galactosa, etc.), disacáridos (sacarosa, lactosa y maltosa) y polisacáridos (almidón).
  
- **Fibra cruda.** Celulosa y fracciones de hemicelulosa (algunos incluyen la lignina).

Ninguno de los materiales de la pared celular de los vegetales se sujeta a la digestión hidrolítica por las enzimas digestivas glandulares de los mamíferos, sin embargo la celulosa, la hemicelulosa y la pectina se encuentran sujetas a la acción hidrolítica de los complejos de enzimas microbianas conocidas como celulasas.

Este sistema enzimático libera a los monosacáridos y a los polisacáridos de la pared celular.

Para cada uno de los grupos de carbohidratos señalados se desarrollan procesos fermentativos algo distintos, tanto por su intensidad como por las concentraciones relativas de los Ácidos Grasos Volátiles formados, es así que se tendrán diferentes niveles de Ácidos Grasos Volátiles dependiendo si la ración es rica en forrajes o en concentrado (Cuadro 2).

El cambio en los porcentajes de estos ácidos no es un suceso eventual sino el resultado final de un complicado ajuste de la biomasa en el rumen.

Un cambio dramático en la dieta tiene un marcado impacto en el número y tipo de microorganismos presentes en el rumen. Por ejemplo: un alto suministro de concentrados (rico en almidón) en la ración conduce a una alta producción de ácidos orgánicos, disminuyendo el pH ruminal que es propicio para el desarrollo de una flora bacteriana predominante amilolíticas, incrementando la producción de ácido propiónico en el rumen y una relación molar acético = propiónico relativamente estrecha (cerca de 2=1).

Las raciones ricas en forrajes dependen del desarrollo de microorganismos celulolíticos que requieren un pH cercano al neutro (6,0-7,0). Existe una mayor producción de ácido acético y bajo en ácido propiónico, originando una relación ácido acético- propiónico mas amplia (cerca de 3:1). Bondi, (1989).

**Cuadro 2:** Proporción molar promedio de los Ácidos Grasos Volátiles en forrajes y concentrados.

AGV	FORRAJES % mol	CONCENTRADO % mol
Ácido Acético	65	40-45
Ácido Propiónico	20	37-40
Otros (valérico isobutírico) de la degradación protéica.	1-5	1-5

Fuente: Zarate 2008.

- **Degradación Fermentativa de los Carbohidratos más Importantes.** Los animales no rumiantes absorben principalmente monosacáridos de los carbohidratos, los rumiantes absorben Ácidos Grasos Volátiles y poco o ningún monosacárido. Inicialmente, todos los carbohidratos de la dieta son convertidos en glucosa, sin embargo la glucosa está presente solo en forma transitoria y es pronto convertida en Ácidos Grasos Volátiles pasando por piruvato.
- **Proteínas.** Las proteínas son vulnerables al ataque microbiano debido a que están formados por compuestos de carbono. Estos compuestos de carbono son reducidos aún más para proveer energía a los microbios, los aminoácidos dan lugar al amoniaco y a un esqueleto de carbono los cuales se acomodan en varios de los poros en las vías de los Ácidos Grasos Volátiles.

Las proteínas son en particular vulnerables, debido a que están formados por compuestos de carbono, los cuales se pueden reducir todavía más, con el fin de proveer energía para los microbios anaerobios. Para cada uno de los aminoácidos entre las vías de los AGV, primero son desaminados para dar lugar al amoniaco y a un esqueleto de carbono. Las estructuras de carbono de muchos de estos aminoácidos se pueden acomodar directamente en varios de los pasos en las vías de los AGV, dando lugar a la producción de tres AGV principales. Los tres aminoácidos de cadena lateral (AACL) son las excepciones, y permiten la producción de AGV con cadena lateral por medio de las siguientes reacciones:

Valina + 2H<sub>2</sub>O ----- Isobutirato + NH<sub>3</sub> + CO<sub>2</sub>

Leucina + 2H<sub>2</sub>O --- Isovalerato + NH<sub>3</sub> + CO<sub>2</sub>

Isoleucina + 2H<sub>2</sub>O --- 2-metil butirato + NH<sub>3</sub> + CO<sub>2</sub>

Estos AGV de cadena lateral son factores de crecimiento importantes para varias de las especies de bacterias. A pesar de que muchas especies de los microbios rúmiales parecen ser capaces de utilizar aminoácidos preformados, los cuales se derivan de los péptidos absorbidos para la síntesis de proteínas, existen varias especies que no lo pueden hacer. Estas especies tienen que sintetizar sus aminoácidos a partir del amoníaco y de varios metabolitos del carbono procedente de los pasajes de los AGV; sin embargo, para la síntesis de los AACL (aminoácidos de cadena lateral). Se necesitan a los Ácidos Grasos Volátiles de cadena lateral. Lehninger, (1987).

- **Ácidos Grasos Volátiles de Grasas.** Los Lípidos que ingieren los rumiantes, a través de los alimentos son degradados por acción de las esterasas y lipasas bacterianas del rumen, produciendo ácidos grasos libres. La galactosa liberada de los galactolípidos es fermentada por los microorganismos produciendo Ácidos Grasos Volátiles, al igual que el glicerol es metabolizado hasta ácido propiónico. Cunningham. (1995).

Los ácidos grasos libres insaturados (con uno o más dobles enlaces). Sufren el proceso de hidrogenación ruminal, convirtiéndose en saturados con igual número de átomos de carbono (ejemplo: el linoleico y linolénico se transforman en esteárico). Con este proceso, los rumiantes modifican el tipo de ácidos grasos que acumulan en los tejidos que son mayormente saturados.

En el caso especial de los rumiantes, el acetato, butirato y cuerpos cetónicos, también están disponibles para su catabolismo inmediato.

- **Importancia de los Ácidos Grasos Volátiles.** Los Ácidos Grasos Volátiles, además de su rol como fuente de energía para el rumiante, también son utilizados como principales precursores para la síntesis de diferentes compuestos orgánicos en el metabolismo intermediario como en el caso de la síntesis de grasa corporal, en los vacunos de engorde. En este proceso, el ácido acético es utilizado como precursor, pero siempre y cuando el ácido propiónico se encuentre en cantidad suficiente como para activar las enzimas responsables de la síntesis de lípidos en el tejido adiposo del organismo del animal.

De aquí se desprende que no es la concentración parcial de un ácido la que definitivamente determina un aumento o una disminución en la síntesis de grasa corporal sino la relación entre los ácidos grasos, acético y propiónico.

Los Ácidos Grasos Volátiles de importancia nutritiva en el rumen son los formados en él, como los ácidos acético, propiónico y butírico, productos principales del metabolismo de los carbohidratos en el rumen. Estos son las fuentes de energía más importantes y realizan misiones de síntesis en los rumiantes.

La eficiente energía atrapada en el compuesto de alta energía ATP, se obtiene en dos fases de metabolismo de los Ácidos Grasos Volátiles: 1. Transformación microbiana de la glucosa hasta Ácidos Grasos Volátiles. 2. Oxidación de los Ácidos Grasos Volátiles absorbidos, que se realiza en los tejidos.

Además los Ácidos Grasos Volátiles absorbidos realizan funciones de síntesis: los ácidos acético y butírico son los productos iniciales para la síntesis de grasas corporal y de la leche, y el ácido propiónico para la glucosa.

La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), y trazas de hidrógeno (H<sub>2</sub>); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana, Opatpatanakit *et al.* (1994); Schofield *et al.* (1994). La producción de gas desde la fermentación de la proteína es relativamente pequeña y la derivada desde la grasa es insignificante. (Makkar 2001).

En la prueba de producción de gas *in vitro* usando tampón de bicarbonato, el CO<sub>2</sub> es también producido en la neutralización de los AGV generados. Pell y Schofield (1993). Para los forrajes, cuando el tampón de bicarbonato es usado, alrededor del 50% del volumen total de gas producido tiene este origen, y puede aproximarse al 60% en dietas con alta proporción molar de propionato. Getachew *et al.* (1998). El CO<sub>2</sub> producido desde el tampón puede encontrarse asumiendo que por cada mmol de AGV producido se libera 0.8-1.0 mmol de CO<sub>2</sub>, dependiendo de la cantidad de tampón de fosfato presente. Opatpatanakit *et al.* (1994); Makkar (2001).

Los datos de producción de gas y AGV no han sido muy relacionados en los estudios hasta ahora realizados con los datos de fermentación *in vivo* del rumen de los mismos alimentos.



Cuando los carbohidratos son fermentados a ácidos grasos de cadena corta, gases (principalmente CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) y células microbiales, se dice que un alimento fue incubado con una mezcla de solución buffer y líquido ruminal *in vitro*. La producción de gas es básicamente el resultado de la fermentación de los carbohidratos a acetato, propionato y butirato. Wolin, (1960); Beuvink y Spoelstra, (1992); Blummel y Orskov, (1993); citados por Ruiz. (2005).

Los gases producidos en la fermentación de la proteína son relativamente pequeños si se comparan con la producción de gas que proviene de la fermentación de los carbohidratos. Wolin, (1960); citado por Ruiz, (2005).

El gas que se produce principalmente cuando el sustrato es fermentado a acetato y butirato, es el que resulta de la técnica de producción de gas. Cuando se libera gas solamente de la formación del ácido, se dice que sucedió la fermentación del sustrato a propionato, por lo que una producción menor de gas esta asociada a la producción de propionato. Wolin, (1960); Van Soest, (1994); citados por Ruiz, (2005).

Por consiguiente la proporción molar de acetato y propionato es usada para poder evaluar las diferentes relaciones con el sustrato. Un cambio en la proporción de ácidos grasos de cadena corta se verá reflejada por cambios en la producción de gas. Getachew *et al.* (2005); citado por Ruiz, (2005).

Los AGV contribuyen a los requerimientos tanto de los animales como de los seres humanos y se ha demostrado que el orden de utilización de los ácidos grasos de cadena corta es butirato, acetato y propionato.



La formación de ácido propiónico es la única reacción que requiere de H<sub>2</sub>; por lo que cualquier remanente de H<sub>2</sub> es usualmente convertido a CH<sub>4</sub>. Igualmente, la producción de propionato no involucra la generación de CO<sub>2</sub>. Williams (2000).

La vía completa de producción de AGV desde dietas altas en forraje fue resumida por Beever (1993) como:

1 mol de hexosa → 1.34 mol acetato+0.45 mol propionato+0.11 mol butirato+0.61 mol metano+4.62 mol ATP.

La cantidad y la proporción molar de acetato (a), propionato (p) y butirato (b) determina las moles de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> producidas. La estequiometría de Wolin (1960) asume que el balance de oxidación neta de todos los productos es igual a cero ( $a+p+b+CO_2+CH_4=0$ ), que el CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> son producidos únicamente desde el acetato y el butirato y que relativamente al acetato, el doble de la cantidad de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> es generada desde la formación de butirato ( $CO_2+CH_4=a+2b$ ). Después de algunas sustituciones, la ecuación resultante es:  $CO_2=a/2+p/4+1.5*b$ . Así, las moles de CO<sub>2</sub> producidas pueden ser calculadas desde la cantidad y proporción molar de acetato, propionato y butirato, y una vez las moles de CO<sub>2</sub> son conocidas, las moles de CH<sub>4</sub> pueden ser calculadas de acuerdo a:  $CH_4=(a+2b)-CO_2$ . Blümmel *et al* (1997); Makkar (2001).

En conclusión, la técnica de producción de gas mide la cantidad de gas liberado directamente como un producto de la fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado. Schofield *et al* (1994).

El gas es producido principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. La fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido; por consiguiente, una menor producción de gas es asociada con la fermentación propiónica. Getachew *et al.* (1998).

## 2.4 ESPECIES FORRAJERAS EMPLEADAS

### 2.4.1 Morera (*Morus alba*).

- **Características Taxonómicas y Morfológicas.**

**Nombre común:** Morera

**Especie:** *Morus alba*

**Género:** *Morus*

**Familia:** Moraceae

**Orden:** Urticales

- **Introducción.** Árbol que tradicionalmente se ha utilizado para la alimentación del gusano de seda en diferentes países. Aunque esta especie es nativa de Asia, se ha adaptado de manera excelente a gran diversidad de condiciones edafoclimáticas y en la actualidad es reconocida como una de las especies multipropósito más versátil. Su uso como forraje comenzó a partir de la década del ochenta en América Central debido a sus excelentes características bromatológicas.

Benavides (2000), citado por Medina *et al.* (2007), reportó contenidos de proteína cruda superiores al 20% y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS) por encima del 80%. Otro de los aspectos sobresalientes de esta planta es su producción de biomasa, la cual puede alcanzar hasta 30 t MS/ha/año en sistemas intensivos de corte y acarreo, además de su alta retención de hoja durante el período seco. Martín, (2004); citado por Medina *et al.* (2007).

Según Sánchez (2002), citado por Medina *et al.* (2007), el método fundamental y más utilizado de propagación en esta especie es el asexual, ya que constituye una forma fácil y rápida de conservar las características de la planta madre.

La morera (*Morus alba*) es probablemente el árbol mejor conocido de China. Su cultivo se remonta a la antigüedad y todas las partes del árbol (brotes, hojas, tallos, raíces y frutos) son utilizadas en medicina tradicional china desde hace miles de años para el tratamiento de diversas enfermedades. El empleo de la hoja de morera como remedio popular contra la diabetes ha sido tradicional también en algunos países del Este de Europa y en los Balcanes.

Además de los citados usos tradicionales, en Oriente, de las moreras de un año se extraen fibras textiles con las que se confeccionan diversos tejidos.

La madera de morera adulta es granada, vetada, dura y duradera, resistente al ataque de la carcoma, por lo que siempre ha sido muy valorada en ebanistería.

Las hojas de la morera han sido tradicionalmente utilizadas para la alimentación del ganado, fundamentalmente de ovejas y cabras en tiempo donde la comida tradicional escasea

Las moreras también han desempeñado un importante papel en la huerta como sujetadoras de la tierra, en la puerta de las barracas y en los parques y jardines de nuestras calles, como árbol ornamental. Por su carácter caducifolio, dan sombra y refrescan en verano, mientras que en invierno dejan pasar los caloríficos rayos del sol.

Las moreras contribuyen también a la biodiversidad ya que tanto sus frutos, como sus semillas, son comidos por multitud de pájaros e insectos de nuestro entorno.

Por último, en países del Oriente, las hojas tiernas de morera también han formado parte de la dieta de las personas, tanto como ingrediente importante de algunos platos como en infusiones.

- **Botánica.** La planta de morera es de fácil desarrollo y de producción anual.
- **Tallo.** Árbol caducifolio puede alcanzar de 10 a 20 m de talla. Con la corteza grisácea, copa redondeada y abiertamente ramificada. Vive alrededor de los 120-150 años. Las ramas principales son largas y muy ramificadas, ramillas grisáceas-amarillentas con brotes pubescentes.

- **Inflorescencia.** Flores en amentos de color crema o verdosos, estando las flores femeninas y masculinas (unisexuales) en los mismos pies o en pies separados (monoicas o dioicas). Fruto de color rosado o rojo oscuro, y normalmente de menor tamaño y en menor cantidad.
- **Hojas.** Hojas anchamente ovadas a orbicular-ovadas, con ápice agudo o cortamente acuminado. Base semitruncada o subcordada, oblicua. Borde dentado o irregularmente lobulado. Son de consistencia blanda. Tienen el haz lampiño y el envés ligeramente tomentoso en las axilas de los nervios principales.
- **Frutos.** Produce gran cantidad de frutos comestibles y muy atractivos para la avifauna. Los Frutos son pequeños, blancos, rosados o a veces negruzcos, formado por una infrutescencia compuesta por numerosas drupas. Los frutos son aqueniformes, en infrutescencias carnosas (sorosis) blancas o blanquecino-rosadas.
- **Desarrollo Vegetativo.** Se multiplica por semillas y esquejes. Las variedades se obtienen por injerto. Ampliamente cultivado para la cría del gusano de seda.
- **Exigencias Edafoclimáticas.** Resiste temperaturas bastante extremas, tanto fríos como calores, aunque de jóvenes le dañan los fríos intensos. Es resistente a la sequía y acepta bien la poda, pero las podas continuas disminuyen la calidad y la vida del árbol.

- **Exigencias En Suelo.** Es rústico en cuanto a la naturaleza del suelo, pero los prefiere sueltos y que estén bien drenados. No de pH ácido.

#### 2.4.2 Maíz (*Zea mays*)

##### 1.4.2.1 Características Taxonómicas y Morfológicas.

**Nombre común:** Maíz

**Especie:** *Zea mays*

**Género:** *Zea*

**Familia:** Gramíneas

- **Introducción.** El maíz es un cultivo muy remoto de unos 7000 años de antigüedad, de origen indio que se cultivaba por las zonas de México y América central. Hoy día su cultivo está muy difundido por todo el resto de países y en especial en toda Europa donde ocupa una posición muy elevada. EEUU es otro de los países que se destaca por su alta concentración en el cultivo de maíz.

Su origen no está muy claro pero se considera que pertenece a un cultivo de la zona de México, pues sus hallazgos más antiguos se encontraron allí.



El maíz (*Zea mays*), representa uno de los aportes más valiosos a la seguridad alimentaria mundial. Junto con el arroz y el trigo son considerados como las tres gramíneas más cultivadas en el mundo. Asimismo, en el transcurso del tiempo, diversas instituciones mundiales, estatales y privadas vienen realizando estudios serios con el objetivo principal de incrementar los niveles de rendimiento y de producción de nuevos y mejorados híbridos para desarrollar variedades con un alto nivel productivo, resistentes al clima y a las enfermedades. (INFOAGRO, 2007).

- **Botánica.** La planta del maíz es de porte robusto de fácil desarrollo y de producción anual.
- **Tallo.** El tallo es simple erecto, de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura, es robusto y sin ramificaciones. Por su aspecto recuerda al de una caña, no presenta entrenudos y si una médula esponjosa si se realiza un corte transversal.
- **Inflorescencia.** El maíz es de inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina separada dentro de la misma planta.

En cuanto a la inflorescencia masculina presenta una panícula (vulgarmente denominadas espigón o penacho) de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen en el orden de 20 a 25 millones de granos de polen. En cada florecilla que compone la panícula se presentan tres estambres donde se desarrolla el polen. En cambio, la inflorescencia femenina marca un menor contenido en granos de polen, alrededor de los 800 o 1000 granos y se forman en

unas estructuras vegetativas denominadas espádices que se disponen de forma lateral.

- **Hojas.** Las hojas son largas, de gran tamaño, lanceoladas, alternas, paralelinervias. Se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presenta vellosidades. Los extremos de las hojas son muy afilados y cortantes.
- **Raíces.** Las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo y suele ocurrir en aquellas raíces secundarias o adventicias.
- **Desarrollo Vegetativo.** Desde que se siembran las semillas hasta la aparición de los primeros brotes, transcurre un tiempo de 8 a 10 días, donde se ve muy reflejado el continuo y rápido crecimiento de la plántula.

El maíz se ha tomado como un cultivo muy estudiado para investigaciones científicas en los estudios de genética. Continuamente se está estudiando su genotipo y por tratarse de una planta monoica aporta gran información ya que posee una parte materna (femenina) y otra paterna (masculina) por lo que se pueden crear varias recombinaciones (cruces) y crear nuevos híbridos para el mercado.

Los objetivos de esto cruzamientos van encaminados a la obtención de altos rendimientos en producción. Por ello, se selecciona en masa aquellas plantas que son más resistentes a virosis, condiciones climáticas, plagas y que desarrollen un

buen porte para cruzarse con otras plantas de maíz que aporten unas características determinadas de lo que se quiera conseguir como mejora de cultivo. También se selecciona según la forma de la mazorca de maíz, aquellas sobre todo que posean un elevado contenido de granos sin deformación.

- **Exigencias Edafoclimáticas.** El maíz requiere una temperatura de 25°C a 30°C. Requiere bastante incidencia de luz solar y en aquellos climas húmedos su rendimiento es más bajo. Para que se produzca la germinación en la semilla la temperatura debe situarse entre los 15°C a 20°C.

El maíz llega a soportar temperaturas mínimas de hasta 8°C y a partir de 30°C pueden aparecer problemas serios debido a mala absorción de nutrientes minerales y agua. Para la fructificación se requieren temperaturas de 20 a 32°C.

- **Pluviometría.** Las aguas en forma de lluvia son muy necesarias en periodos de crecimiento en unos contenido de 40 a 65 cm.
- **Riegos.** El maíz es un cultivo exigente en agua en el orden de unos 5mm al día. Los riegos pueden realizarse por aspersión y a manta. El riego más empleado últimamente es el riego por aspersión.

Las necesidades hídricas van variando a lo largo del cultivo y cuando las plantas comienzan a nacer se requiere menos cantidad de agua pero sí mantener una humedad constante. En la fase del crecimiento vegetativo es cuando más cantidad

de agua se requiere y se recomienda dar un riego unos 10 a 15 días antes de la floración.

La fase de floración es el periodo más crítico porque de ella va a depender el cuajado y la cantidad de producción obtenida por lo que se aconsejan riegos que mantengan la humedad y permita una eficaz polinización y cuajado. Por último, para el engrosamiento y maduración de la mazorca se debe disminuir la cantidad de agua aplicada.

- **Exigencias En Suelo.** El maíz se adapta muy bien a todos tipos de suelo pero suelos con pH entre 6 y 7 son a los que mejor se adaptan. También requieren suelos profundos, ricos en materia orgánica, con buena circulación del drenaje para no producir encharques que originen asfixia radicular.

#### **2.4.3 Torta de Soya (*Glicine max*)**

- **Características Taxonómicas y Morfológicas.**

**Nombre común:** Soya

**Especie:** *Glicine max*

**Genero:** *Glicine*

**Familia:** Fabáceas

- **Introducción.** La soya ha sido utilizada como alimento humano desde 3000AC. En la China antigua, era considerada uno de los cinco granos sagrados y un componente importante de la dieta. Se consumió la soya cocida, fermentada o procesada industrialmente. En el mundo occidental, la soya no ha sido fácilmente aceptada debido a la gran disponibilidad de grasas animales. A partir de la segunda guerra mundial, cuando en los Estados Unidos la soya se cultivó en gran escala, se la utilizó como alimento para el ganado y en procesos industriales. La soya se cultiva hoy en diversas partes del mundo y es un alimento que constituye una solución potencial para resolver los problemas nutritivos en las regiones tropicales.

- **Características.** Los componentes principales del grano de soya son la proteína y el aceite. Los cultivares mejorados contienen un promedio de 38 a 42% de proteína y 18% a 22% de aceite, considerando el peso seco de la semilla. La proteína de soya se caracteriza por un equilibrio entre los aminoácidos, con bajas concentraciones de los aminoácidos azufrados, metionina, cistina y elevadas concentraciones de lisina y triptófano. Los cereales presentan una situación inversa, y por lo tanto, mediante la combinación de la soya con los cereales es posible obtener un alimento de buena calidad proteínica. De la soya se preparan diversos tipos de comida, incluyendo bebidas, pastas, quesos y condimentos fermentados, algunos parecidos a la leche, el queso y la carne.

### 3. MODELO METODOLÓGICO

#### 3.1 LOCALIZACION

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Valle del Cauca, donde se llevaron a cabo las pruebas de Digestibilidad Enzimática *in vitro* en Cerdos, la Prueba de Fermentación en Jeringas y la determinación de Fibra Detergente Neutra y en el Laboratorio de Nutrición de Rumiantes y Calidad de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Valle del Cauca, Colombia con la Prueba de Determinación de Ácidos grasos Volátiles.

#### 3.2 MATERIAS PRIMAS

En esta investigación se evaluaron 3 materias primas o tratamientos, Morera (*Morus alba*) como fuente de fibra (forraje), Maíz (*Zea mays*) como fuente energética y Torta de Soya (*Glicine max*) como fuente proteica (Tabla 1).

Se cosecharon las hojas y tallos maduros, de Morera y se consiguió la torta de soya y el maíz en una tienda de abastecimiento de materias primas de la ciudad de Palmira. La muestra de Morera se secó a 60° C durante un periodo de 48 horas. Todas las muestras se molieron en un molino Wiley Mill 2 de cuchillas para tejidos con un tamaño de partícula de 1mm y se conservaron en tarros plásticos individuales para su análisis.

La especie vegetal empleada en este ensayo fue cosechada en la Granja Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

**Tabla 1:** Materias primas evaluadas. Tratamientos

TRATAMIENTO	MATERIA PRIMA
Tratamiento 1 (T1)	Morera
Tratamiento 2 (T2)	Maíz
Tratamiento 3 (T3)	Torta de Soya

A las tres materias primas se les analizó el contenido de MS (105°C por 24 horas), Cenizas (550°C por 8h), Grasa (105°C 6-8h), Energía Bruta, Proteína Bruta, Lignina y Fibra Detergente Neutra (FDN). Leterme y Estrada, (2001), (Tabla 2).

En las Tablas 3 y 4 se presenta la composición química de dos de las materias primas utilizadas en este trabajo de investigación, maíz y torta de soya respectivamente.

**Tabla 2:** Composición química de las materias primas evaluadas

MATERIAS PRIMAS	ANÁLISIS							ENERGIA (Kcal/Kg)
	MATERIA SECA		CENIZAS (%)	GRASAS (%)	FIBRAS			
	M.S (%)	M.S TOTAL (%)			FDN (%)	FDA (%)	LDA (%)	
MORERA	92,75	24,24	17,05	4,66	49,33	18,48	4,67	2395
MAIZ	88,15		1,27	4,49	26,19	4,53	-5,32	3262
TORTA DE SOYA	91,23		6,07	1,27	45,45	7,89	-0,64	3776

### 3.3 INOCULOS

**3.3.1 Rumiantes.** Para la toma del líquido ruminal se trabajó con animales cebú fistulados de CIAT, Palmira, Valle del Cauca, alimentados con torta de soya, pasto estrella y agua a voluntad. El líquido ruminal se recolectó en un termo y se selló herméticamente para su traslado, esto con el fin de conservar el inóculo a una temperatura constante de 39°C.

**3.3.2 Monogástricos.** Se recolectó muestra de heces frescas, antes de que cayeran al suelo, de 3 cerdos jóvenes de la Granja Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Alimentados con concentrado para cerdos, morera seca y molida y agua a voluntad. Este alimento se suministró en un periodo de 3 semanas antes de cada prueba. Las heces se mezclaron homogéneamente y se colocaron en bolsas plásticas dentro de un recipiente con CO<sub>2</sub> a una temperatura de 39°C para impedir que los microorganismos presentes en ellas murieran.



**Tabla 3.** Composición química (%) del Maíz.

<b>COMPOSICION QUIMICA</b>	
<b>MAÍZ</b>	
Materia seca (%)	86.4
Proteína bruta (%)	8.1
Celulosa bruta (%)	2.2
Aceites y grasas brutas (%)	3.7
Cenizas (%)	1.2
Cenizas insolubles (%)	0.0
FDN (%)	1.5
FDA (%)	0.4
LDA (%)	0.2
Pared celular (%)	9.1
Almidón (%)	64.1
Azúcares totales (%)	1.6
Energía bruta (Kcal/Kg)	3860

Fuente: Sauvant et al., 2002

**Tabla 4.** Composición química (%) de la torta de soya.

COMPOSICION QUIMICA	
TORTA DE SOYA	
Materia seca (%)	87.6
Proteína bruta (%)	47.2
Celulosa bruta (%)	3.9
Aceites y grasas brutas (%)	1.5
Cenizas (%)	6.3
Cenizas insolubles (%)	0.3
FDN (%)	1.3
FDA (%)	0.7
LDA (%)	0.3
Pared celular (%)	
Almidón (%)	
Azúcares totales (%)	0.8
Energía bruta (Kcal/Kg)	4120

Fuente: Sauvant et al., 2002

### 3.4 TRATAMIENTOS

Se analizaron 12 tratamientos así: (3 materias primas (Morera, Maíz y Torta de Soya) x 2 especies (Rumiantes y Monogástricos) x 2 sistemas de tratamientos, (Con Predigestión (CP) y Sin Predigestión (SP)) = 12 tratamientos). (Tabla 5).

**Tabla 5.** Tratamientos utilizados en los análisis de laboratorio.

TRATAMIENTO	MATERIA PRIMA	INOCULO
T1	Morera con Predigestión	Cerdo
T2	Maíz con Predigestión	Cerdo
T3	Torta de Soya con Predigestión	Cerdo
T4	Morera sin Predigestión	Cerdo
T5	Maíz sin Predigestión	Cerdo
T6	Torta de Soya sin predigestión	Cerdo
T7	Morera con Predigestión	Rumiantes
T8	Maíz con Predigestión	Rumiantes
T9	Torta de Soya con Predigestión	Rumiantes
T10	Morera sin Predigestión	Rumiantes
T11	Maíz sin Predigestión	Rumiantes
T12	Torta de Soya sin predigestión	Rumiantes

### 3.5 INSUMOS

**3.5.1 Digestibilidad enzimática in vitro en cerdos.** Los materiales y equipos utilizados en las predigestiones se muestran a continuación en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Insumos para la prueba de predigestión.

ITEM	DESCRIPCION	OBSERVACION
<b>ANIMALES</b>	Bovinos Cerdos	Para la toma de liquido ruminal Para la toma de heces
<b>MATERIAS PRIMAS</b>	Morera Maíz Torta de Soya	
<b>INSUMO Y MAQUINARIA</b>	Erlenmeyers de 250 ml Crisoles de porcelana con porosidad 2 ml Tela de nylon Probetas de 10, 20, 50, 100, 250 y 2000 ml Beakers de 50 y 1000 ml Magnetos Probetas de 10, 20, 50, 100, 250 y 2000 ml Desecador Baño María con agitación	
<b>REACTIVOS</b>	Etanol 96% Acetona 99.5% Pepsina porcina Chloranfencol Agua destilada	



**3.5.3 Determinación de Fibra Detergente Neutra.** En la determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN) se utilizaron los insumos descritos en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Insumos utilizados en la determinación de la FDN.

ITEM	DESCRIPCION
<b>ANIMALES</b>	Bovinos Cerdos
<b>MATERIAS PRIMAS</b>	Morera Maíz Torta de Soya
<b>INSUMO Y MAQUINARIA</b>	Beakers de 250 ml Balón volumétrico Magnetos Crisoles de porcelana con porosidad 2 Tela de nylon Digestor para fibras Gerhardt Estufa a 105°C Desecador Balanza Mufla
<b>REACTIVOS</b>	Solución detergente neutra Agua destilada Etanol Alcohol Agua caliente HPO <sub>3</sub>

**3.5.4 Medición Ácidos Grasos Volátiles.** Los insumos utilizados para la medición de AGV se muestran a continuación en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Insumos utilizados en la medición de Ácidos Grasos Volátiles

ITEM	DESCRIPCION
<b>ANIMALES</b>	Bovinos Cerdos
<b>MATERIAS PRIMAS</b>	Morera Maíz Torta de Soya
<b>INSUMO Y MAQUINARIA</b>	Balón aforado de 100 ml Tubos eppendorf Centrifuga Filtro con disco Durapore de fase PVDF Viales de 2 ml Cromatógrafo
<b>REACTIVOS</b>	Acido acético Acido sulfúrico Acido láctico

## 3.6 METODOLOGIA

**3.6.1 Digestibilidad enzimática in vitro en Cerdos.** La prueba de predigestión *in vitro* Tiene como objetivo principal simular las digestiones ocurridas en el estómago y el intestino delgado del cerdo utilizando pepsina y pancreatina, para obtener el porcentaje de digestibilidad de las materias primas a estudiar.

Se realizaron para las tres materias primas 6 períodos o predigestiones de una duración de 8 horas cada uno, con 9, 10, 15 Y 30 repeticiones por materia prima según el caso:

Para los periodos 1 y 2 se realizaron nueve (9) repeticiones por cada una de las tres materias primas evaluadas y tres (3) blancos, para los periodos 3 y 4, 15 repeticiones para las materias primas torta de soya y maíz, en el periodo 5, 30 repeticiones de torta de soya y en la última y sexta predigestión 10 repeticiones de cada una de las 3 materias primas evaluadas.

Estas variaciones en las repeticiones se debieron a la cantidad de residuo que iba quedando al final de cada periodo de las materias primas evaluadas.

Se evaluó al final de cada periodo la digestibilidad de la materia seca de las materias primas. La predigestión se realizó según el protocolo descrito por Boudry *et al.* (2003), el cual es una modificación del protocolo descrito por Boisen y Fernández (1997).



- **Protocolo Predigestión *in vitro*.**

## **PASO 1.**

Se utilizaron 0.5g de materia prima previamente seca y molida (>1mm), se colocaron en erlenmeyers de 250ml, se cubrieron con parafilm para evitar contaminaciones. Este mismo día se prepararon las soluciones a utilizar en la prueba, a excepción de las soluciones de pepsina y pancreática las cuales debieron ser preparadas en el momento de la prueba. Las soluciones fueron las siguientes:

### **Solución tampón fosfato 0.1 M, pH 6.0**

Para obtenerla se requirió de la preparación previa de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M (13.609g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / litro agua destilada) y de una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M (14.196g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / litro agua destilada); para luego mezclarlas en cantidades de 25 ml de la solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M con 175ml de la solución  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M.

### **Solución tampón fosfato 0.2 M, pH 6.8**

Para obtenerla se requirió de la preparación previa de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2M (27.218g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / litro agua destilada) y de una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M (28.392g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / litro agua destilada); para luego mezclarlas en cantidades de 99ml de la solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M con 101ml de la solución  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2M.

### **Solución de HCL 0.2 M**

Se disolvieron 16ml de HCL 37% en un litro de agua destilada.

### **Solución de HCL 1 M**

Se disolvieron 8ml de HCL 37% en 100 ml de agua destilada.

### **Solución de NaOH 1 M**

Se disolvieron 4g de NaOH en pastillas en 100 ml de agua destilada.

### **Solución NaOH 0.6 M**

Se disolvieron 24g de NaOH en pastillas en 1 litro de agua destilada.

### **Solución Pepsina**

Se disolvieron 25mg de pepsina porcina en 1 ml de HCL 0.2M.

### **Solución Cloranfenicol**

Se disolvieron 0.5g de chloranfenicol en 100ml de etanol.

### **Etanol 96%**

### **Acetona 99.5%**

El día de la realización de la prueba se preparó la solución Pepsina descrita anteriormente. A cada erlenmeyers se le adicionó 25ml de la solución Tampón Fosfato (0.1M, pH6.0), acompañado de 10ml de ácido clorhídrico (HCL 0.2M), se ajustó el pH a 2.0 con la ayuda de las soluciones de HCL 1M y NaOH 1M y por último se le agregó 1 ml de la solución pepsina y 0.5 ml de la solución de cloranfenicol. Luego se colocaron en el baño María a 39°C con agitación constante durante 2 horas (Figura 2).

**Figura 2.** Baño María con los erlenmeyers en el interior.



## **PASO 2.**

En el segundo paso se le agregaron 10 ml de la solución Tampón Fosfato (0.2M, pH 6.8), 5ml de Hidróxido de sodio (NaOH 0.6M) y se ajustó el pH a 6.8 con ayuda de soluciones de NaOH 1M y de HCL 1M. Se mezcló suavemente agregando 1ml de la enzima Pancreatina, se cerraron los erlenmeyers con la ayuda del parafilm y se llevó al baño maría a 39°C durante cuatro (4) horas bajo agitación suave y continua.

### PASO 3.

En el tercer paso se filtró con tela de nylon (Figura 3) el residuo de los erlenmeyers con ayuda de agua destilada al sistema de filtración usando crisoles porosidad 2. Se lavó cada muestra durante 3 minutos aproximadamente con 10 ml de etanol al 96% y con 10 ml de acetona al 99.5%. Por último, recuperaron los residuos no digeridos. Estos residuos se llevaron al horno para ser secados a 60°C durante 24 horas (Figura 4). Los residuos una vez secados fueron pesados y con estos datos se hicieron los cálculos necesarios para evaluar Digestibilidad enzimática de la MS con ayuda de la siguiente formula:

$$\% \text{ MS degradada} = \frac{\text{gr MS inicial} - \text{gr MS final}}{\text{gr MS inicial}} * 100$$

Donde:

gr MS inicial = gr MS del forraje antes de la predigestión

gr MS final = gr MS del forraje después de la predigestión

**Figura 3.** Filtración (Tela de Nylon).



**Figura 4.** Diagrama de flujo de la Digestibilidad *in vitro*.



### 3.6.2 Prueba de fermentación en jeringas, Monogástricos Vs Rumiantes.

- **Monogástricos (Cerdos).** Esta prueba pretende simular la fermentación que ocurre en el intestino grueso de los cerdos y para ello se utilizó el protocolo descrito por Boudry *et al.* (2003) el cual es una modificación del protocolo descrito por Menke y Steingass (1988).

Con los residuos que se obtuvieron de la prueba anteriormente descrita (digestibilidad enzimática *in vitro* en cerdos) se realizó la prueba de fermentación de jeringas de vidrio, utilizando heces de cerdo como inóculo para los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, y 6. En los tratamientos 4, 5 y 6, se utilizaron las materias primas sin predigestión (Tabla 6)

- **Rumiantes (Bovinos).** Esta prueba pretende simular la fermentación que ocurre a nivel ruminal y para ello se utiliza el protocolo descrito por Menke y Steingass (1988) descrito anteriormente.

Los residuos de la prueba de digestibilidad enzimática *in vitro* en cerdos fueron la materia prima para realizar la prueba de fermentación de jeringas de vidrio, utilizando líquido ruminal como inóculo para los tratamientos 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En los tratamientos 10, 11 y 12, se utilizaron las materias primas sin predigestión (Tabla 7)

**Tabla 6.** Tratamientos Con Predigestión (CP) y Sin Predigestión (SP) con inoculo de Cerdos

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>INOCULO</b>
T1	Morera con Predigestión	Cerdo
T2	Maíz con Predigestión	Cerdo
T3	Torta de Soya con Predigestión	Cerdo
T4	Morera sin Predigestión	Cerdo
T5	Maíz sin Predigestión	Cerdo
T6	Torta de Soya sin predigestión	Cerdo

- **Cinética de Producción de Gas.**

Se realizaron cuatro periodos utilizando 60 jeringas por periodo, 30 para rumiantes, 30 para monogástricos de 144 horas cada uno y se evaluaron 4 repeticiones y 12 tratamientos de cada una de las materias primas. La lectura del volumen de las jeringas se realizó a las 2, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas luego de introducir las jeringas en el baño María a 39°C.

**Tabla 7.** Tratamientos Con Predigestión (CP) y Sin Predigestión (SP) con líquido ruminal (Bovino)

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>INOCULO</b>
T7	Morera con Predigestión	Bovino
T8	Maíz con Predigestión	Bovino
T9	Torta de Soya con Predigestión	Bovino
T10	Morera sin Predigestión	Bovino
T11	Maíz sin Predigestión	Bovino
T12	Torta de Soya sin predigestión	Bovino

- **CERDOS.**

El día anterior al inicio de la prueba de fermentación se marcaron las jeringas y sus respectivos émbolos, (Figura 5), estos se engrasaron con vaselina y se pusieron en bandejas para una mejor organización. Se pesó y colocó 200mg de muestra en cada jeringa, se puso el embolo hasta donde estaba la muestra y se les puso el clip. Las jeringas se organizaron en bandejas y se llevaron a la estufa a 39°C hasta el día de la prueba, y se prepararon las siguientes soluciones:

#### **Solución A (Micro Minerales)**

Se preparó con 13.2mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1gr de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 8gr de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100ml de agua destilada.



### **Solución B (Micro Tampón)**

Se preparó con 35.0g de  $\text{NaHCO}_3$  + 4.0g de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 1litro de agua destilada.

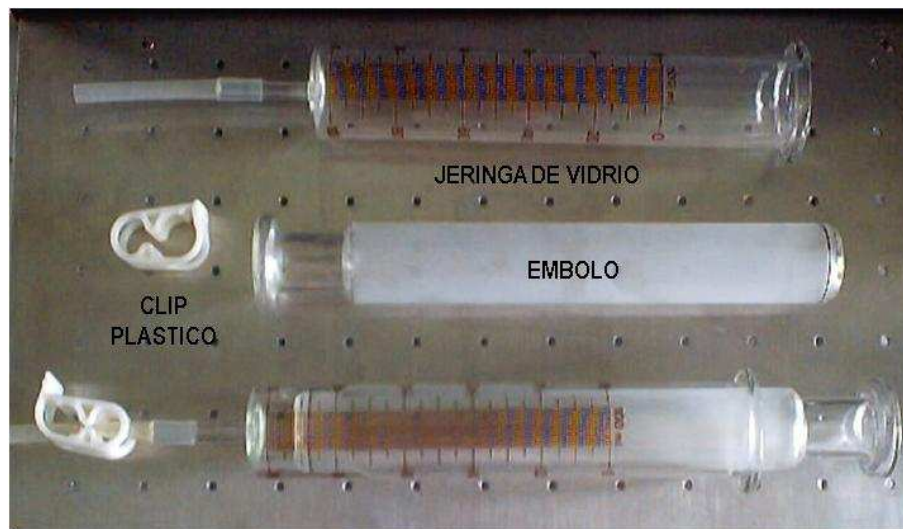
### **Solución C (Macro Minerales)**

Se preparó con 5.7g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6.2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.6g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1litro de agua destilada.

### **Solución D (Indicador de Oxido Reducción)**

Se preparó 100mg de  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NO}_4\text{Na}$  (Résazurine) en 100ml de agua destilada.

**Figura 5:** Partes de una Jeringa utilizada para la determinación de la prueba de fermentación.



Al día siguiente, se prendió el baño María a 39°C e inmediatamente se recolectaron las heces frescas antes de caer al suelo de los dos cerdos de la Granja Mario González Aranda. Las heces recolectadas se introdujeron en una bolsa plástica y esta a su vez al termo para mantener la temperatura y para impedir la muerte de los microorganismos. Rápidamente se llevaron al laboratorio y se metieron al baño María a 39°C con CO<sub>2</sub>. Se preparó la solución E pesando 570mg del reactivo Sodium sulfide, agregándole 4ml de NaOH 1N y 95ml de agua destilada.

Se preparó la solución tampón mezclando las soluciones A, B, C y D, adicionando CO<sub>2</sub> en el baño María. Las cantidades fueron:

**Solución A:** 0.24ml

**Solución B:** 474ml

**Solución C:** 474ml

**Solución D:** 2.44ml

Esta solución tampón se llevó un agitador sin retirarle el CO<sub>2</sub> y poco a poco se le adicionó la solución E, hasta que ocurrió la decoloración.

Las heces se mezclaron homogéneamente y en las bolsas para el stomacher se pesaron 200mg repartidos en 2 bolsas y se llevaron nuevamente al baño María. Después de 10 minutos en el baño María y con CO<sub>2</sub> constante, a cada bolsa se le adicionó un poco de la solución tampón y se llevaron al stomacher durante 50seg a 260 RPM.

Cuando las heces se sacaron del stomacher se colaron con un cernidor de 250 micras en una jarra plástica. Una vez cernidas todas las bolsas se llevaron al baño María con CO<sub>2</sub> por 10 minutos y se mezclaron con la solución tampón en un tarro de vidrio con entrada para CO<sub>2</sub>.

Cada jeringa se llenó con 30ml de la solución tampón mezclada con las heces. Una vez se llenaron las jeringa el aire que quedó dentro de ellas se extrajo y cerraron con el clip para evitar perdidas de la solución. Una vez cerradas las jeringas se realizó la lectura del volumen inicial (Vo) teniendo como referencia la línea del pistón y se llevaron al baño María a 39°C (Figura 6).

La lectura del volumen de las jeringas se realizó a las 2, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Cada vez que se realizó una lectura se debió agitar la jeringa para lograr homogenizar la muestra. Cuando el nivel del pistón sobrepasó los 60ml, todo el gas contenido en la jeringa debió se extraído y el pistón debió ser colocado en la posición inicial. La fermentación de forrajes en jeringas debe realizarse durante 144 horas, ya que en este tiempo la curva de producción de gas se estabiliza, para otros alimentos con menor contenido de fibra la fermentación puede ir hasta las 72 horas únicamente.

Antes del desmonte de la prueba, se realizó la última lectura de volumen (144 horas), se pasó el residuo de cada jeringa a tubos falcón de 50ml y se centrifugaron por 10 minutos a 5.000 RPM. Por último se les sacó el residuo líquido y se guardaron las muestras congeladas para su posterior análisis.

**Figura 6:** Incubación de las jeringas en el Baño María a 39°C.



- **RUMIANTES.**

El día anterior al inicio de la prueba de fermentación se marcaron las jeringas, los émbolos, y estos se engrasaron con vaselina. Se pesó y colocó 200mg de muestra en cada jeringa, se organizaron en bandejas y se llevaron a la estufa a 39°C hasta el día de la prueba, y se prepararon las soluciones A (Micro Minerales), B (Micro Tampón), C (Macro Minerales) y D (Indicador de Oxido Reducción), descritas anteriormente.

Al día siguiente, se recolectó 450ml de líquido ruminal de animales fistulados del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT y su recolección se hizo en un termo herméticamente cerrado para mantener la temperatura constante a 39°C

hasta que llegó al laboratorio. La muestra se metió al baño María a 39°C con CO<sub>2</sub> y se preparó la solución E (Solución Tampón).

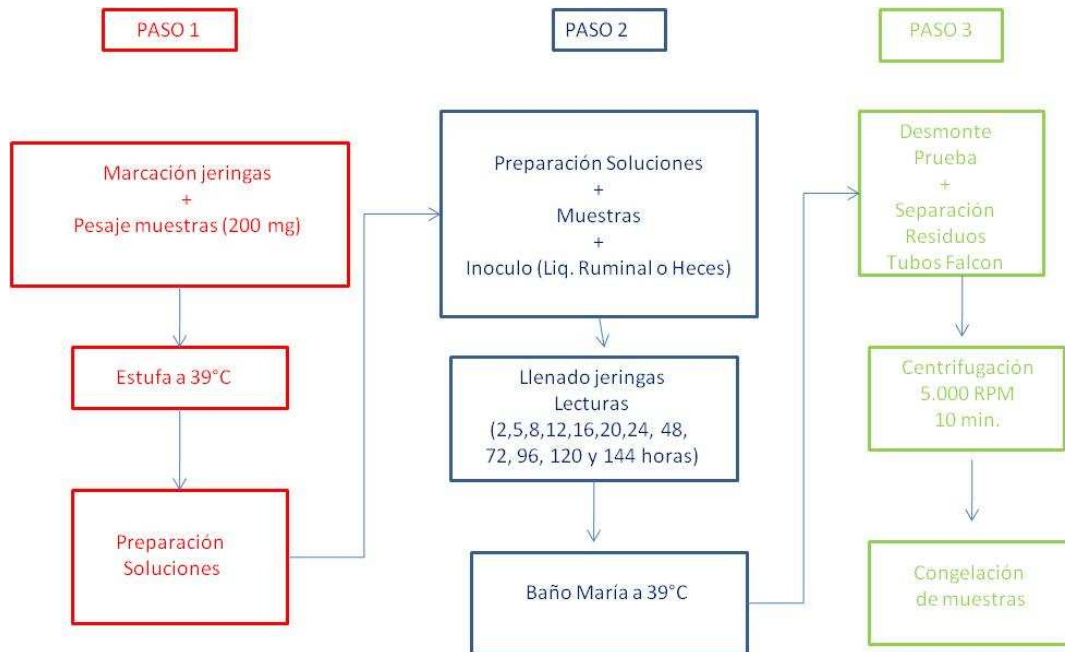
Esta muestra no es necesaria pasarla por el stomacher, pero si colarla por un cernidor de 250 micras en una jarra plástica. Una vez cernido todo el líquido ruminal la jarra se llevó nuevamente al baño María a 39°C y se mezcló con la solución tampón en un tarro de vidrio con CO<sub>2</sub> constante.

Cada jeringa se llenó con 30ml de la solución tampón mezclada con el líquido ruminal y se les extrajo el aire que quedó dentro de ellas, se cerraron con el clip para evitar perdidas de solución, se realizó la primera lectura de volumen (Vo) y se llevaron al baño María a 39°C.

La lectura del volumen de las jeringas con liquido ruminal se realizó a las 2, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Al igual que en la lectura de producción de gas en Cerdos, cuando el nivel del pistón sobrepasó los 60ml, todo el gas contenido en la jeringa se extrajo y el pistón se colocó en la posición inicial.

Por último, se hizo la lectura final (V144 horas) y se pasó el residuo de las jeringas a tubos falcón de 50ml, estos se centrifugaron por 10 minutos a 5.000 RPM, se les botó el residuo líquido y se guardaron las muestras congeladas para su análisis posterior (Figura 7).

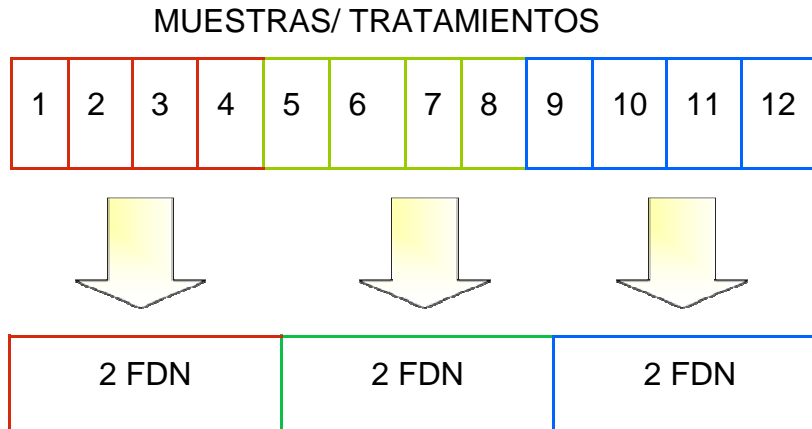
**Figura 7:** Diagrama de flujo de la Prueba de fermentación en jeringas Monogástricos Vs Rumiante.



### 3.6.3. Determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN).

Cuando se terminó la fermentación de las jeringas, las muestras que para cada tratamiento eran 4 se juntaron quedando 2 valores de degradación de FDN por tratamiento y por periodo (Figura 8).

**Figura 8:** Número de muestras para la determinación de FDN.



Esta prueba se realizó al finalizar la prueba de fermentación en jeringas y con ella se determinó la cantidad de materia degradada durante este periodo de fermentación. La prueba de determinación de Fibra Detergente Neutra se realizó según el protocolo descrito por Makkar (2003) y consta de:

- **Protocolo para determinar la degradación de Fibra Detergente Neutra.**

Se preparó una Solución Detergente Neutra (SDN) con sulfato laurel sódico, EDTA (ácido etilendiamina tetracético), tetraborato de sodio decahidratado, fosfato dibásico de sodio anhidro, glicol etilénico monoetiléter y todo esto se disolvió en agua destilada. Se agitó y se calentó para facilitar la solubilidad.

Se utilizó de 0.5gr a 1gr de materia prima, se colocaron en beakers y se les adicionó 100ml de SDN y se pusieron a hervir en un digestor para fibras Gerhardt (Figura 9) durante una hora con refrigeración para evitar la evaporación. Este

procedimiento tiene como objetivo solubilizar los microorganismos y obtener únicamente FDN no degradada. Pasada esta hora se filtró cada muestra en crisoles con tela de nylon obteniendo el residuo de los beakers con ayuda de agua destilada al sistema de filtración usando crisoles de porosidad 2. Cada muestra se lavó con 800ml de agua caliente, con etanol y alcohol.

Estos residuos se llevaron a la estufa a 105°C durante 24 horas. Una vez secados los residuos se pusieron en un desecador aproximadamente 1 hora y se pesaron obteniendo el dato de Fibra detergente Neutra en gramos.

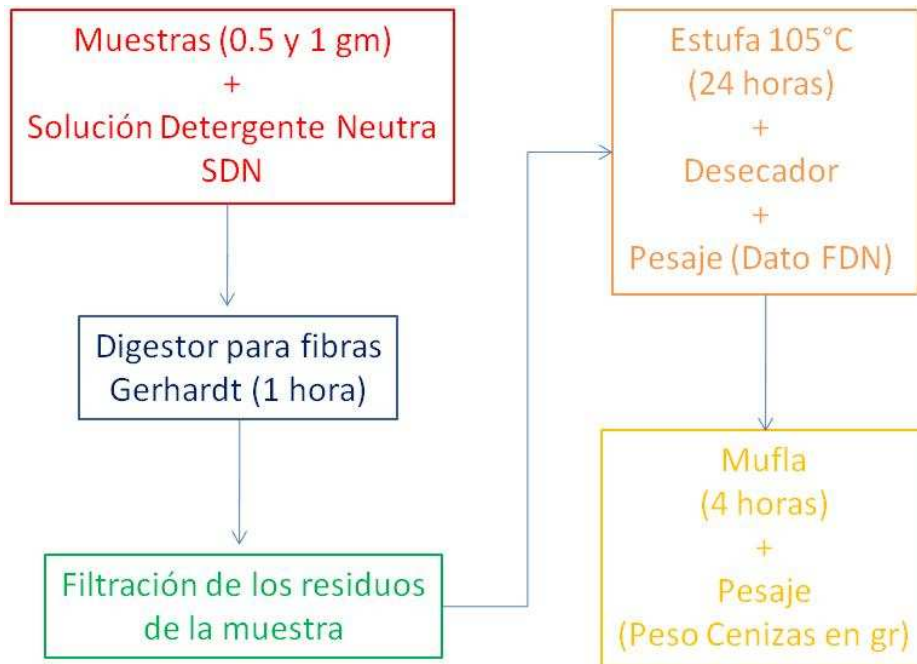
Finalmente, las muestras se llevaron a la mufla por un periodo de 4 horas y se pesaron para obtener el peso de las cenizas en gramos (Figura 10).

**Figura 9:** Digestor para fibras Gerhardt en la digestión del contenido de las jeringas con solución detergente neutra.





**Figura 10:** Diagrama de flujo de la determinación de fibra detergente neutra.



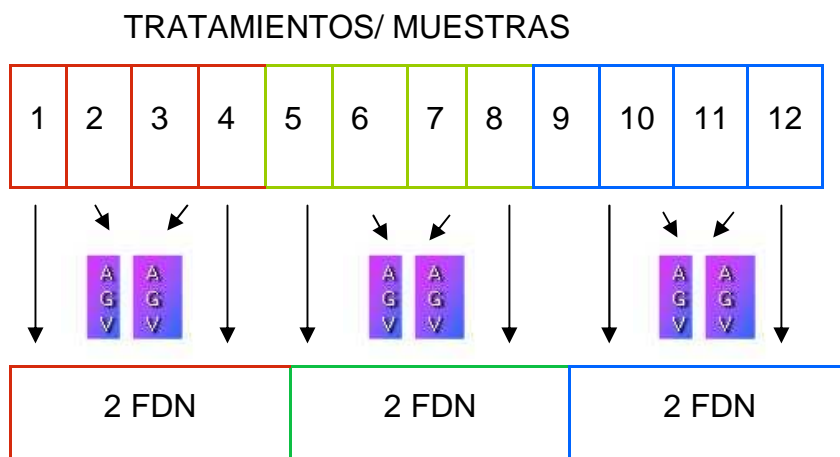
#### 3.6.4. Prueba de determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV).

Esta prueba tiene como objetivo principal determinar los AGV principalmente, ácido acético, utilizando ácido metafosfórico, para obtener los mm/L de las materias primas a estudiar. La determinación de AGV, se hizo según el protocolo de la prueba de Cromatografía Líquida High Performance Liquid Chromatography "HPLC", con una columna de Aminex HPX-87H (Bio-Rad lab, Hercules y ácido Sulfúrico 0.006M a un flujo de 0.09ml por minuto de fase móvil. Hartemin *et al.* (1997).

Inicialmente se preparó la solución desproteinizadora con 25gr de ácido metafosfórico (HPO<sub>3</sub>) disuelto en 50ml de agua destilada, se llevó a un balón aforado de 100ml, se enrasó con agua destilada y se agitó hasta que la solución se tornó transparente. Se realizó la prueba para los 12 tratamientos tomando una alícuota de 800µl de la muestra del sobrenadante obtenido en la prueba de fermentación (Figura 11) y se mezcló con 200µl de la solución desproteinizadora recolectado en tubos eppendorf de 1.5ml. Estos se congelaron antes de ser procesadas como medio de conservación y fueron llevados al Laboratorio de Calidad de Forrajes y Nutrición de Rumiantes del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.

Una vez listas las muestras, se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minuto, cuando estuvieron bien homogenizadas la mezcla se filtró con disco de Durapore de fase PVDF, catalogo SJHV013NS de millipore de 13mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45µm. Lo filtrado se recogió en vial de 2ml y se le inyectó 20µl en el HPLC (figura 12).

**Figura 11:** Toma de la muestra de AGV.

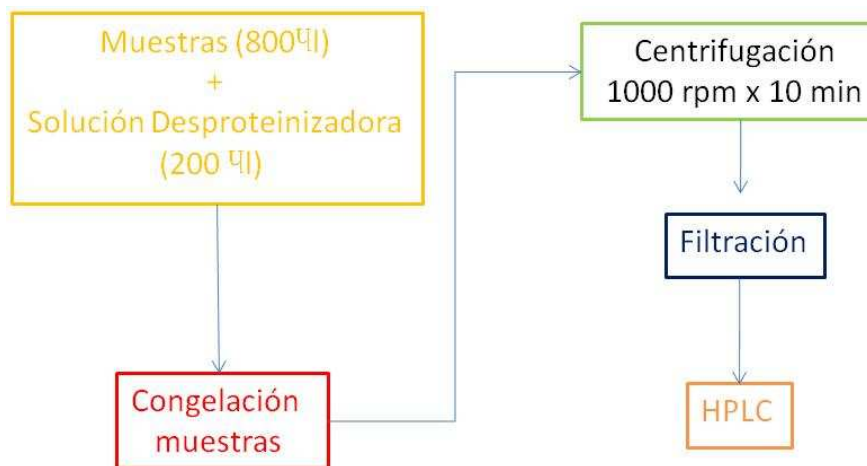


Para calcular la concentración del ácido acético se prepararon dos soluciones Stock, una de 1000ppm (0.025g de ácido acético / 25ml de solución de ácido sulfúrico a 0.006M), a partir de esta se prepararon soluciones estándares con rangos de concentración entre 50, 150 y 250ppm. La otra solución stock se preparó de 10000rpm (0.25g de ácido acético / 25ml de solución de ácido sulfúrico a 0.006M) e igualmente de esta se prepararon soluciones estándares con rangos de concentración entre 350, 450 y 550ppm. Con estos seis puntos ya se pudo realizar la curva de calibración de ácido acético de menor concentración.

Para la curva de ácido acético de mayor concentración se preparó una solución stock de 25000ppm (0.625g de ácido láctico / 25ml de solución de ácido sulfúrico a 0.006M). A partir de esta se prepararon soluciones estándares con rangos de concentración entre 3000, 4500, 6000, 7500, 9000 y 10500ppm.

Se procedió al calentamiento del horno de columna de forma gradual comenzando en 30 grados Celsius por 10 minutos y posteriormente se siguió aumentando de 10 en 10 grados hasta llegar a 60 conservando siempre entre cambio 10 minutos.

**Figura 12:** Diagrama de flujo de la determinación de AGV.



El aumento de flujo, igualmente se realizó de forma gradual comenzando de 0.2ml/min hasta llegar a 0.9ml/min. Entre los cambios de flujo se debió manejar igualmente un tiempo de 10 minutos.

Las curvas de calibración del ácido acético se veían reflejadas en el cromatógrafo para ser analizadas estadísticamente.

### 3.7 CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**3.7.1 Digestibilidad Enzimática in vitro Monogástricos vs Rumiantes.** La digestibilidad enzimática de la materia seca se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MS degradada} = \frac{\text{g MS inicial} - \text{g MS final}}{\text{G MS inicial}} \times 100$$

g MS inicial = g MS del forraje antes de la predigestión

g MS final = g MS después de la predigestión

**3.7.2 Prueba de fermentación en jeringas.** En esta prueba se incluyeron los blancos en cada periodo, los cuales sirvieron como factores de corrección de los resultados (Boudry et al, 2003).

Los datos que se obtuvieron de los blancos se promediaron y se obtuvo un solo dato el cual se utilizó como factor de corrección.

El volumen de gas acumulado durante la fermentación de las jeringas se calculó de la siguiente manera:

$$V_c = \left( \{V_t - V_o\} - \sum \left\{ \frac{V_{bt}}{V_{bo}} \right\} \right) * \left\{ \frac{1000 \text{ MS}}{M} \right\}$$

Donde:

$V_t$  = Volumen en tiempo  $t$  en la jeringa (ml/g MS)

$V_o$  = Volumen inicial de la jeringa (ml)

$V_{bt}$  = Volumen de gas acumulado producido por el blanco en tiempo  $t$  (ml/g MS)

$M_s$  = Peso de materia seca de la muestra

$M$  = Cantidad de muestra a incubar (g MF)

Este calculo lo que nos permitió fue expresar la producción de gas en volumen en función de la cantidad de la materia seca que se puso en las jeringas para ser incubada.

La cinética de producción de gas se ajustó y se analizó con el método propuesto por France et al. 1993.

$$Y = A \{ 1 - \exp[ - b (t - T) - c (\sqrt{t} - \sqrt{T}) ]$$

Donde:

$Y$  = La producción de gas acumulada en ml

$t$  = Tiempo de incubación en horas

$A$  = Asíntota (gas total; ml)

$T$  = Periodo de latencia en horas

$b$  y  $c$  = Constantes ( $h^{-1}$  y  $h^{-1/2}$ ).

La evaluación de la producción de gas en jeringas se realizó con los residuos obtenidos de la predigestión *in vitro*.

La fermentación en las jeringas de las tres materias primas tanto para cerdos como para rumiantes se realizó durante 144 horas ya que en este tiempo se observa mejor la estabilización de la curva de producción de gas para forrajes (Morera), materias primas con menor contenido de fibra se podrían incubar hasta las 72 horas, Ruiz, 2005.

**3.7.3 Prueba de determinación de Fibra Detergente Neutra.** La FDN se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FDN degradada} = \frac{\text{Residuo gr}^1 - \text{Cenizas gr.}}{\text{Muestra Inicial}^2 * \text{Materia Seca Analítica}} * 100$$

Donde:

<sup>1</sup> = Residuos después de la filtración

<sup>2</sup> = Gramos de la muestra colocados en las jeringas

Los análisis estadísticos para todas las pruebas se hicieron con la ayuda del programa SAS, (SAS/STAT versión 9.1, 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Antes de correr los datos según el análisis, a todos los datos se le hizo el test de normalidad de Shapiro Wilk, ya que se debían utilizar datos paramétricos para una mejor salida de los datos.

Para este análisis se tuvieron en cuenta probabilidades de  $\alpha \geq 0.05$  para normalidad de los datos y  $\alpha \leq 0.05$  para anormalidad de los mismos. Los datos que mostraron diferencias significativas se marcaron con ( $P \leq 0.05$ ) y los que no mostraron diferencias significativas con ( $P \geq 0.05$ ).

Para la prueba de Predigestión se utilizó un diseño experimental completamente al azar y las variables utilizadas se sometieron a una ANDEVA y se utilizó el test de DUNCAN el cual marco las diferencias entre los periodos y las materias primas con letras.

Para las demás pruebas se utilizó el test de TUKEY para la separación de medias incluido en el paquete SAS; este test también marco las diferencias entre los promedios por medio de letras.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. MONOGÁSTRICOS

#### 4.1.1 Digestibilidad Enzimática *in vitro*

En la Tabla 8 se observa que las tres materias primas presentan diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) en la digestibilidad enzimática, siendo Torta de Soya la materia prima mas digestible (82.72%), debido tal vez a que es una fuente proteica, con bajos contenidos de fibra y cenizas.

**Tabla 8.** Digestibilidad enzimática de Morera, Maíz y Torta de Soya

TIPO DE MUESTRA	DIGESTIBILIDAD (%)
Morera	47.09 <sub>a</sub>
Maíz	74.26 <sub>b</sub>
Torta de Soya	82.72 <sub>c</sub>

Promedios con diferente letra difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ );

La baja digestibilidad de Morera podría ser explicada por su alto contenido de fibra (49%) y cenizas (17%), comparados con el Maíz con (26.19%) de fibra y (1.27%) de contenido de cenizas. Sin embargo estos resultados no concuerdan, pues Torta de Soya también presentó valores altos de fibra y por lo tanto se esperaría tuviera baja digestibilidad, siendo esta la materia prima que mayor digestibilidad presentó (82.72%).

Hay que tener en cuenta que el valor de fibra para Morera obtenido en esta investigación no concuerda con la literatura, pues fue demasiado alta. Gonsalvo *et al.* (2001) reportó para Morera un valor de fibra del 28% y Trigueros y Villalta (1997), citados por González (2004), reportaron un valor de 32.2%.

Ruiz (2005), en un estudio donde determinó la digestibilidad enzimática *in vitro* de cinco forrajes encontró para Morera una digestibilidad del (48.2%), dato muy similar al reportado en este trabajo.

Quirama y Caicedo (2003), explican que la presencia de fibra en la fuente alimenticia cualquiera que esta sea y en particular el contenido de lignina afecta la digestibilidad de los nutrientes como materia orgánica, fibra, proteína, aminoácidos, minerales, Energía Digestible (ED), Energía Metabolizable (EM) y Energía Neta (EN).

Le Goff y Noblet (2001), obtuvieron como resultado de sus ensayos que la presencia de la fibra en la dieta reduce la digestibilidad aparente ileal de la proteína cruda, igualmente Jorgensen *et al.* (1996), citados por Ruiz (2005),

reportaron que la digestibilidad ileal de la materia orgánica, la proteína y la energía se encuentran relacionadas con el consumo de fibra dietética.

La morera es una planta que presenta una composición química de gran valor nutricional resaltando la digestibilidad *in vitro* de MS que oscila entre (57.9% y 82.4%) Ly *et al* (2001) y Phiny *et al* (2003) citados por González *et al* (2004), mientras que el contenido proteico puede variar entre (15 y 28%), Sánchez (1999) con una digestibilidad total aparente de (74% a 86%); González *et al* (2002); el contenido de ceniza puede alcanza hasta (25%), y la fracción fibrosa, específicamente la lignina, se encuentra entre (7.1% y 8.1%) en hojas y corteza, lo cual es considerablemente baja al compararla con otros arbustos forrajeros de similares características, Shayo (2001) citado por González *et al* (2004).

El resultado de digestibilidad enzimática *in vitro* de la materia seca de este trabajo presenta una tendencia similar a lo reportado por Botero (2004), quien hizo un ensayo de digestibilidad ileal *in vivo* con cerdas adultas, donde obtuvo el (41.6%) de digestibilidad para Morera, utilizándola en las dietas en un 30%.

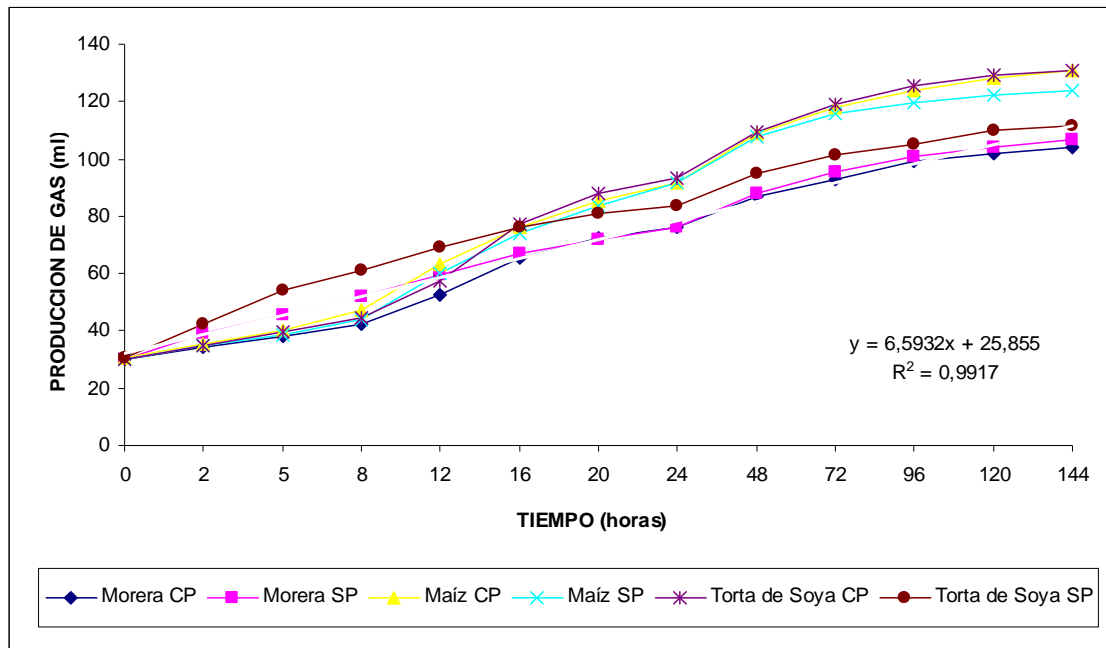
La digestibilidad de una materia prima puede reducirse por sus altos contenidos de fibra y energía o viceversa. Stanogias y Pearce (1985), encontraron que la digestibilidad aparente de la materia seca, energía y nitrógeno de las dietas disminuye linealmente cuando los niveles de FDN aumentan.

#### 4.1.2. Prueba de Fermentación en Jeringas

- **Cinética de producción de gas**

En la Gráfica 1 se muestran las tendencias de la producción de gas *in vitro* en cerdos para Morera, Maíz y Torta de Soya con predigestión (CP) y sin predigestión (SP).

**Gráfica 1.** Cinética de Producción de gas *in vitro* en el intestino grueso del cerdo con las materias primas Morera, Maíz y Torta de Soya con predigestión y sin predigestión.



Se puede observar que aunque las cinéticas de producción de gas de las tres materias primas estudiadas tanto CP como SP son similares, las curvas de producción de gas de Maíz CP, Maíz SP y Torta de Soya CP fueron más altas que las demás materias primas.

La cinética de producción de gas de Torta de Soya SP tuvo un comportamiento diferente a las curvas de las otras materias primas durante las primeras 16 horas de incubación, pero a partir de este momento su comportamiento es similar aunque superior a la producción de gas de Morera CP y Morera SP. Siendo estas tres materias primas las menores productoras de gas.

Morera CP, Maíz CP, Maíz SP y Torta de Soya CP, tuvieron comportamientos similares en cuanto a la cinética de producción de gas durante las primeras 8 horas, a partir de este momento Maíz CP y SP y Torta de Soya CP sufren un cambio y suben notoriamente su producción de gas hasta las 144 horas de incubación.

En general, esta gráfica muestra que las materias primas con mayor producción de gas en la mayoría de los casos son aquellas que se incubaron en el tracto digestivo del cerdo con predigestión y la mayor parte del gas fue producido dentro de las 24 horas después de iniciada la fermentación. Sarria, *et al.* (2006) nos dicen que este es el tiempo aproximado de tránsito de las partículas a través del intestino grueso del cerdo.

El tipo de alimento o su clasificación, dependiendo de su caracterización bromatológica y aporte nutricional demostró tener una influencia directa sobre la producción final de gas como indicador de la digestibilidad; aun más, demostrando que los alimentos fibrosos, en este caso Morera, producen una menor cinética de fermentación que los energéticos (Maíz) o los proteicos (Torta de Soya), esto debido probablemente a la mayor cantidad de carbohidratos solubles rápidamente fermentables y a una mayor sincronización en la tasa de liberación de nutrientes para la fermentación microbial; claro está que se debe tener presente que esta producción de gas mayor no tiene que ver necesariamente con la digestibilidad de la fibra; pues la mayor producción de gas puede estar ligada a una mayor producción de ácido propiónico y en general de AGV que aumentan la producción de gas indirectamente hasta en un 50%, por ende, es necesario medir la tasa de síntesis microbial degradación de la fibra y producción de AGV para poder concluir correcta o certeramente sobre los resultados encontrados.

- **Producción total de gas**

La Tabla 9 muestra la producción de gas para las diferentes materias primas en cerdos.

**Tabla 9.** Producción total de gas *in vitro* para Morera, Maíz y Torta de Soya con sus interacciones (CP y SP) en cerdos.

<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>PREDIGESTION (CP / SP)</b>	<b>PRODUCCIÓN DE GAS (ml)</b>	<b>Pr ≥ [t]</b>
<b>Maíz</b>	CP	137.01 <sup>a</sup>	≤ 0.0001
	SP	122.93 <sup>b</sup>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	104.46 <sup>c</sup>	≤ 0.0001
	SP	107.10 <sup>c</sup>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	130.90 <sup>a</sup>	≤ 0.0001
	SP	112.90 <sup>ab</sup>	≤ 0.0001

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente ( $P \geq 0.005$ ); altamente significativos

En general existen diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre todas las materias primas en sus dos diferentes formas de presentación. Se puede observar que el Maíz CP fue la materia prima con mayor producción de gas (137.01ml), seguida de Torta de Soya CP y Maíz SP

La producción total de gas fue superior en Maíz (129.97ml), seguido por Torta de Soya (121.94ml) y Morera (105.80ml), encontrando diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre ellas. La baja producción de gas de Morera podría deberse a su alto contenido de FDN.

Las materias primas con predigestión tuvieron mejor producción de gas (124.12ml) que las que no predigeridas (114.34ml). Igualmente se encontró diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre estas.

Si bien el cerdo es un monogástrico es conocida su capacidad para digerir alimentos con elevado contenido en fibra. Se sabe que la digestión de la fibra ocurre en el ciego del intestino grueso de los monogástricos (semejante al rumen) y la población bacteriana es semejante en calidad, mas no en cantidad a la del rumen, los monogástricos se caracterizan por una actividad microbiana relativamente escasa en comparación a la de los rumiantes, los cuales por su gran tamaño de estómago crean un ambiente propicio para la enorme población de microorganismos, Sánchez (2009). A nivel de la microflora no existen protozoos, lo que sugiere que la degradación de las células bacterianas es distinta. Vervaeke y Col (1989), Citados por Campagna (2005).



Varel y Col. (1985), citados por Campagna (2005), encontraron que un incremento en el número de microorganismos celulolíticos en animales alimentados con harina de alfalfa al 96% se logra a expensa de la reducción de otros microorganismos de la flora normal.

Si a los animales monogástricos se les acostumbra a consumir materias primas altas en fibra como son los forrajes en su dieta, la microflora en el intestino grueso de los cerdos aparentemente cambia a una gran población de organismos celulolíticos y hemicelulolíticos en respuesta a la administración prolongada de estas dietas (Varel *et al.* 1984).

- **Producción de Ácidos Grasos Volátiles AGV**

En la Tabla 10, se presentan los resultados de la producción total de AGV para las tres materias primas CP y SP.

**Tabla 10.** Producción de Ácidos Grasos Volátiles AGV para Morera, Maíz y Torta de Soya con sus interacciones (CP y SP) en cerdos.

<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>PREDIGESTION (CP / SP)</b>	<b>PRODUCCION DE AGV (mm/litro)</b>	<b>Pr ≥ [t]</b>
<b>Maíz</b>	CP	78.10 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
	SP	68.21 <sub>c</sub>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	64.50 <sub>d</sub>	≤ 0.0001
	SP	78.35 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	72.11 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
	SP	72.41 <sub>b</sub>	≤ 0.0001

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente ( $P \geq 0.005$ ); altamente significativos.

Morera SP y Maíz CP fueron las materias primas con mayor producción de AGV. La producción mas bajo la obtuvo el Maíz SP.

Cuando se evaluaron las materias primas Morera, Maíz y Torta de Soya con respecto a la producción de AGV se encontró que no hubo diferencias estadísticas entre ellas (73.15mm/litro, 71.43mm/litro y 72.26mm/litro) respectivamente. Las materias primas SP tuvieron mejores producciones de AGV (72.99mm/litro), sin embargo no hubo diferencias estadísticas con las materias primas CP (71.57mm/litro), ya que su comportamiento fue muy similar.

En la mayoría de los casos producciones altas de AGV, se deben a la alta producción total de gas, Blummel *et al.* (1999). Esto concuerda con los resultados obtenidos para Morera SP y Maíz CP ya que estas fueron las materias primas que obtuvieron los valores mas altos en cuanto a producción de gas se refiere.

En la tabla 11 podemos ver claramente el perfil de ácidos grasos volátiles (Acido acético, propiónico, isobutírico, butírico, desconocidos y AGV totales) para cada una de las materias primas evaluados con sus interacciones (CP y SP) en cerdos.

**Tabla 11.** Producción enzimática y Perfil de AGV para Morera, Maíz y Torta de Soya, con predigestión (CP) y sin predigestión (SP) en el tracto gastrointestinal del cerdo.

ACIDOS GRASOS VOLATILES (%)							
ESPECIE	MATERIA PRIMA	PREDIGESTION CP/SP	Acido Acetico	Acido propionico	Acido Isobutirico	Acido Butirico	AGV TOTAL mm/litro
Cerdos	Morera	CP	46,84a	16,45b	3,35a	8,80c	59,85c
	Maiz		40,21b	17,05b	2,74b	14,56a	76,68a
	Torta de Soya		45,13a	19,51a	2,76b	10,28b	72,11b
	Morera	SP	41,55a	15,27b	4,19a	8,66c	75,53a
	Maiz		40,60a	18,91a	2,84c	14,64a	71,77b
	Torta de Soya		36,39b	15,44b	3,41b	9,77b	70,57b

Al observar la tabla 11 para cerdos con las materias primas CP, vemos que Morera y Torta de Soya se comportaron igual en cuanto a la producción de Acido Acético se refiere, Maíz fue la materia prima con menor producción de este acido (40.21%).

En el caso del Acido Propiónico Morera obtuvo el valor mas bajos de este acido, siendo Maíz y Torta de Soya las materias primas con más producción de acido propiónico.

Esta alta producción de Acido Propiónico de Maíz y Torta de Soya se debió tal vez a la buena producción de gas de estas materias primas (129.97 ml y 121.94ml) respectivamente.

Morera fue la materia prima con mayor producción de Acido Isobutírico (3.35%), mientras que Maíz y Torta de Soya tuvieron producciones similares.

En cuanto al Acido Butírico, las tres materias primas se comportaron diferentes, siendo el Maíz la materia prima con mayor producción, seguido de Torta de Soya y Morera.

La proporción molar de acetato y propionato de la fermentación de las leguminosas está influenciada por el sustrato (Blummel & Orskov, 1993, citado por Torres 2009).

Una proporción de almidón rápidamente fermentable produce una mayor cantidad de propionato. Mientras que un menor contenido de almidón produce mayor cantidad de acético, el cual también se presenta cuando el almidón es de lenta fermentación, Getachew, (1998). Esto no concuerda con lo encontrado en este trabajo de investigación, pues si se tiene en cuenta este enunciado Maíz con 64.1% de almidón, Sauvant *et al.* (2002), habría tenido más producción de Acido Propiónico y en este caso fue la materia prima con valor intermedio de este acido y Torta de Soya por ser una materia prima que no contiene almidón, Sauvant *et al.* (2002), tendría que haber producido mas Acido Acético. Esto se aplica para animales rumiantes, en monogástricos, en este caso el cerdo, y teniendo en cuenta las materias primas SP, es diferente pues el almidón en esta especie es degradado a nivel enzimático.

Pero si observamos las materias primas SP, Maíz SP fue la materia prima con mejor producción de Acido Propiónico, seguida de Torta de Soya y Morera.

En cuanto al Acido Acético se refiere, al comparar Maíz, Morera y Torta de Soya en su forma predigerida para cerdos, con la forma no predigerida, vemos que Morera tuvo igual comportamiento, pues produjo la mayor cantidad de este acido (41.55%) y Torta de Soya que fue la materia prima en su estado predigerido con la segunda mejor producción de Acido Acético, para este caso ocupó el tercer lugar de producción (36.69%)

Cuando se utilizan dietas fibrosas habrá la tendencia a producir más Acido Acético. El empleo de materiales fibrosos en esta especie se puede dar debido a la fermentación microbiana que tiene lugar en el tracto gastrointestinal y que puede aportar de 5-40 % de la energía de mantenimiento del hospedero. Paelman *et al.* (1981) y Dierick *et al.* (1989).

El Acido Isobutírico se comportó igual en cuanto al orden de producción para las materias primas Morera CP y SP y Torta de Soya CP y SP, pues fueron estas dos materias primas las de mejores producciones de este gas según el caso. Maíz SP fue la materia prima con menor producción de Acido Isobutírico (2.84%).

Para el caso de la producción de Acido Butírico de las materias primas SP, Maíz fue la materia prima con el porcentaje mas alto de este ácido (14.64%), seguido de Torta de Soya (9.77%) y por último Morera con (8.66%). Esta misma tendencia se dio en las materias primas CP.

El Butirato es utilizado por los colonocitos como fuente de energía, es decir que ayuda a mantener la salud del intestino delgado (Berggren *et al.*, 1993).

En conclusión, la producción de AGV total fue mejor para Morera SP, seguida del Maíz CP y de Torta de Soya CP.

Estos resultados indican que la composición de las materias primas y sus interacciones (CP y SP) afectan los parámetros cecales *in vitro*, determinando el tipo de fermentación. La fermentación potencial, el tiempo de retención de la

digesta en el ciego de los cerdos y la alta o baja producción de AGV, Fondevila *et al* (2002).

Chistensen *et al.* (1999), citados por Ruiz (2005), concuerdan en que las materias primas o dietas con que los cerdos son alimentados tienen mucha influencia sobre las cantidades de producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) producidos durante la fermentación *in vitro* de un afluyente ileal, y son estos AGV producidos por la microbiota, la única forma de energía disponible para el animal.

- **Degradación de Fibra Detergente Neutra FDN**

La degradación de FDN de las diferentes materias primas en cerdos se presenta en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Degradación de FDN para Morera, Maíz y Torta de Soya con sus interacciones (CP y SP) en cerdos.

<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>PREDIGESTION (CP / SP)</b>	<b>DEGRADACION DE FDN (%)</b>	<b>Pr ≥ [t]</b>
<b>Maíz</b>	CP	67.99 <sub>c</sub>	≤ 0.0001
	SP	78.77 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	76.93 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
	SP	88.84 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	79.63 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
	SP	86.92 <sub>a</sub>	≤ 0.0001

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente ( $P \geq 0.005$ ); altamente significativos.



En la degradación de FDN existen diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre todos los forrajes tanto predigeridos como no predigeridos. Morera SP fue la materia prima con mayor porcentaje de degradación de FDN, seguida de Torta de Soya SP y CP.

Los valores de degradación de Morera en este estudio son superiores a los reportados por Ruiz (2005), quien encontró que Morera obtuvo el (46.5%) de degradación de FDN.

Se observó que Maíz con (73%) de degradación de FDN tuvo diferencias significativas en comparación con Morera y Torta de Soya, siendo estas últimas las materias primas de mayor degradación de FDN (83%).

Dung *et al.* (2002) y Dung y Udén (2002), citados por Ruiz (2005), determinaron la digestibilidad *in vitro* de alimentos ricos en fibra con altos contenidos de FDN, utilizando heces de cerdo como inóculo, obteniendo digestibilidades de FDN considerablemente bajas en comparación con otras muestras, esto fue debido probablemente al alto contenido de lignina, cenizas y sílice. El sílice deprime la digestibilidad de la materia orgánica; igualmente Dung *et al.* (2002) citados por Ruiz (2005), reportan que la capacidad del cerdo para digerir y utilizar la fibra, esta afectada principalmente por el origen de la fibra y el contenido de lignina y en menor grado por la cantidad de fibra de la dieta; igualmente encontraron altas correlaciones entre los resultados de digestibilidad de FDN *in vivo* y los valores obtenidos *in vitro*.

Esto no concuerda para este trabajo, pues la materia prima con menor degradación de FDN fue Maíz, siendo esta a su vez, la materia prima que presentó menor contenido de cenizas (1.27%). Se esperaría igualmente que Morera con (17.05%) de cenizas fuera la materia prima menos digerible.

Sin embargo el contenido de cenizas encontrado en este trabajo para Maíz (1.27%) y Torta de Soya (6.07%) coinciden por los contenidos reportados por Sauvart *et al.* (2002), (1.2% y 6.3%) respectivamente.

El contenido de FDN de Torta de Soya si difiere mucho de los reportado en la literatura, pues es este trabajo se encontró un valor muy alto (45%), mientras que Gonzalvo *et al.* (2001) reportó un valor del (23%).

A diferencia de lo que sucedió en las cinéticas de producción de gas, en la degradación de FDN, las materias primas Sin Predigestión fueron mejores (84.84%), que las materias primas predigeridas (74.85%).

Se ha observado que la digestión de FDN está asociada a: tipo de fibra, sitio del tracto gastrointestinal, estado fisiológico del animal, nivel de alimentación y tiempo de retención, entre otros. Dierick *et al.* (1989).

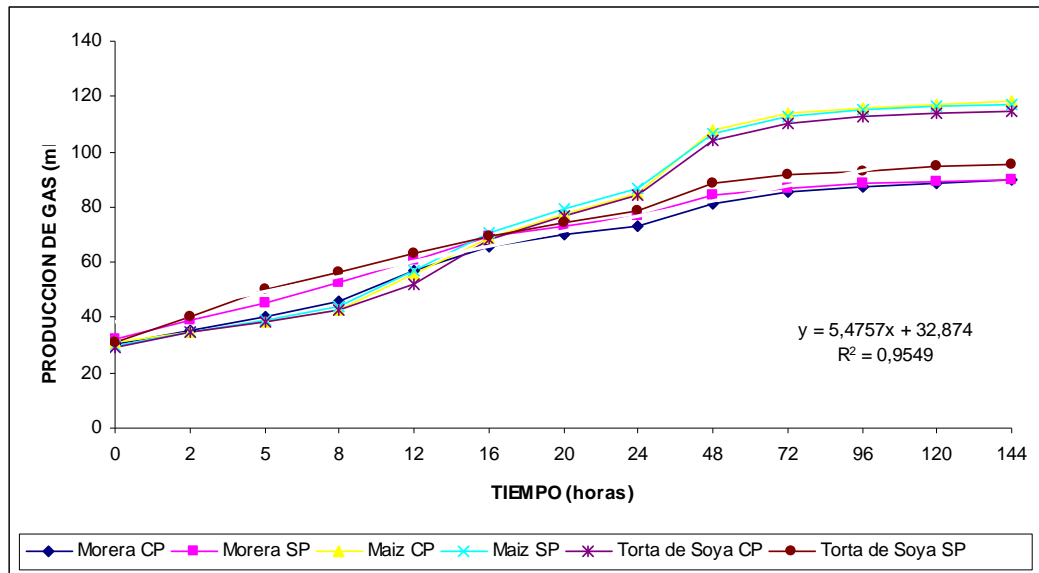
## 4.2 RUMIANTES

### 4.2.1 Prueba de fermentación en jeringas

- **Cinética de producción de gas**

En la Gráfica 2 se muestran las tendencias de la producción de gas *in vitro* de las tres materias primas estudiadas (Morera, Maíz y Torta de Soya) con predigestión (CP) y sin predigestión (SP) en bovinos.

**Gráfica 2.** Cinética de la producción de gas *in vitro* de Morera, Maíz y Torta de Soya con predigestión y sin predigestión para bovinos



Se puede observar que aunque las cinéticas de producción de gas de las materias primas son algo similares, las curvas de producción de gas de Morera CP, Maíz CP, Maíz SP y Torta de Soya CP fueron las mas bajas durante las primeras 12 horas, a partir de allí fueron subiendo su cinética de producción de gas convirtiéndose, a excepción de Morera CP, en las materias primas con mejor producción de gas a las 144 horas.

Morera SP y Torta de Soya SP presentaron las mejores cinéticas de producción de gas durante las primeras 16 horas de incubación, a partir de allí bajan su producción de gas convirtiéndose junto con Morera CP en las tres materias primas de mas baja cinética de producción de gas.

Las materias primas Morera CP y SP tuvieron comportamientos muy similares a partir de la hora 16 de incubación y terminando con producciones de gas similares, aunque bajas.

Morera es una buena fuente de alimento y en especial para animales rumiantes, como forraje tiene una buena cantidad de fibra la cual la hace un alimento menos digestible que el maíz y la torta de soya.

Se ha demostrado una buena relación entre la producción de gas y la degradación de MS *in Vitro*, es decir, materias primas con mayores producciones de gas normalmente presentan buena degradación de MS. Menke *et al.* (1979) encontraron que la producción de gas acumulada en 24 horas estuvo bien correlacionada con la digestibilidad de MO determinada *in vivo* y Sileshi *et al.* (1996) y López *et al.* (1998) citados por Posada y Noguera (2005), han reportado significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de MS *in situ* y la tasa fraccional de producción de gas.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que Morera que es la materia prima con mayor contenido de fibra (49%), fue quien presentó menor producción de gas (90.85ml) que se relaciona con la menor digestibilidad de MS.

Según Weiss (1993), citado por Cruz y Sánchez (2008), Nos dice que en animales rumiantes la fibra se correlaciona negativamente con la digestibilidad de MS y el aporte de energía dentro de una misma clase de alimento. Las dietas con excesos de fibra también tienen un efecto negativo sobre el consumo voluntario.

Cruz y Sánchez (2008) corroboran lo citado por Weiss (1993), cuando en un ensayo de prácticas de alimentación con vacas lecheras alimentadas con raciones con diferentes cantidades de fibra, concluyen que si las dietas no aportan cantidades suficientes de esta, los animales producirán una cantidad de leche más baja y la misma tendrá un porcentaje de grasa menor, lo cual se debe a la depresión que ocurre en el pH ruminal y a el consumo de MS. Así mismo, si las dietas contienen cantidades excesivas de fibra, la producción de leche se reducirá, ya que la fibra se correlaciona negativamente con la digestibilidad de MS.

Maíz CP y SP fueron las materias primas con mayor digestibilidad, pero con el menor contenido de Fibra (26%) y de FDA (4.53%).

La digestibilidad de los materiales vegetales en el rumen esta relacionado con la lignificación y proporción de la pared celular de la planta y árboles forrajeros. Materia primas con bajos contenidos FDN (20%-35%). presenta usualmente alta

digestibilidad y especies con altos contenidos de lignina, son frecuentemente de baja digestibilidad. Álvarez (2001).

Según Linn y Martin (1993), el contenido de FDA también se correlaciona negativamente con la digestibilidad de los alimentos, ya que esta fracción contiene componentes de la pared celular como la lignina que inhiben la acción de los microorganismos ruminales para la degradación de la misma

Esto explica parcialmente el valor nutricional menor de los forrajes tropicales. De los diferentes componentes de FDA, la lignina es el que se asocia más con la depresión en la digestibilidad de MS. Entre los mecanismos por medio de los cuales la lignina inhibe la degradación de la fibra están, su presencia física, el efecto tóxico que los compuestos polifenólicos ejercen sobre los microorganismos ruminales, además de la acción hidrofóbica de la lignina que limita el contacto del agua con los sustratos, lo cual impide el acceso de las celulasas y hemicelulasas a la pared celular. Debido a lo anterior el contenido de FDA se correlaciona negativamente con la digestibilidad de MS y por consiguiente con el aporte de nutrimentos digestibles y de energía de un determinado forraje. Van Soest *et al.* (1991), citados por Cruz y Sánchez (2008).

- **Producción total de gas**

La Tabla 13 muestra la producción de gas de las diferentes materias primas en bovinos.

**Tabla 13.** Producción de gas para Morera, Maíz y Torta de Soya con sus interacciones (CP y SP) en bovinos.

<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>PREDIGESTION (CP / SP)</b>	<b>PRODUCCION DE GAS (ml)</b>	<b>Pr ≥ [t]</b>
<b>Maíz</b>	CP	117.58 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
	SP	108.50 <sub>ab</sub>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	95.00 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
	SP	86.70 <sub>c</sub>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	113.93 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
	SP	95.34 <sub>b</sub>	≤ 0.0001

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente ( $P \geq 0.005$ ); altamente significativos.



En general existen diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre todas las materias primas con predigestión y sin predigestión.

La tendencia del comportamiento de la producción de gas es similar a la encontrada para monogástricos, ya que en rumiantes Maíz CP y Torta de Soya CP también fueron las materias primas que presentaron las mejores producciones de gas (117.58ml y 113.93ml) respectivamente. Estas materias primas por ende, también fueron las que presentaron mayor digestibilidad, recordemos que a mayor producción de gas, mayor digestibilidad.

Álvarez (2001), en un estudio con 6 leguminosa tropicales asociadas con caña de azúcar, encontró correlaciones positivas entre digestibilidad y producción de gas, cuando los porcentajes de caña eran altos, la producción de gas y la degradabilidad eran altos y viceversa.

Wood y Manyuchi (1997) midieron la producción de gas *in vitro* de tres pasturas durante su etapa de fermentación, obteniendo mayores volúmenes de gas cuando las pasturas tuvieron menor contenido de FDN.

Las materias primas con menor producción de gas fueron Morera CP y SP. Otra vez concuerda la correlación negativa entre el nivel alto de FDN y la baja producción de gas.

Este resultado concuerda con estudios hechos por Nsahlai *et al.* (1994) y Larbi *et al.* (1998), y son consistentes con estudios realizados por Getachew *et al.* (2004), citado por Ruiz (2005) quienes utilizaron la metodología descrita por Menke y Steingass (1988) utilizando líquido ruminal como inóculo, obteniendo una correlación negativa entre la producción de gas y FDN.

La producción de gas fue superior para Maíz (113.04ml), seguido de Torta de Soya (104.64ml) y Morera (90.85ml), encontrando diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre ellas.

Las materias primas con predigestión tuvieron mejor producción de gas (108.84ml) que las que no predigeridas (96.85ml). Esta tendencia de producción de gas fue igual en monogástricos, pero aquí hay que tener en cuenta que los animales rumiantes no predigieren los alimentos que consumen, por lo que el factor CP afecta notablemente la materia prima con la que se trabaja. Igualmente se encontró diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre estas.

Según Graciarena y Villaba (2002), La cantidad de gas producido por gramo de MO digerida depende de la fracción de sustrato que se degrade, de esta manera la composición química del forraje condiciona los ml de gas producidos, tanto por efecto del tipo de fracción que se esté degradando en un tiempo determinado dentro de una misma muestra, como por efecto de la composición química per se de los distintos alimentos.

- **Producción de Ácidos Grasos Volátiles AGV**

En la Tabla 14 se presentan los resultados de producción de Ácidos Grasos Volátiles para las tres materias primas utilizadas en este trabajo.

**Tabla 14.** Producción de AGV para Morera, Maíz y Torta de Soya con predigestión y sin predigestión en bovinos.

MATERIA PRIMA	PREDIGESTION (CP / SP)	PRODUCCION	
		DE AGV (mm/litro)	Pr ≥ [t]
<b>Maíz</b>	CP	78.44 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
	SP	81.96 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	64.80 <sub>d</sub>	≤ 0.0001
	SP	74.68 <sub>c</sub>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	76.48 <sub>bc</sub>	≤ 0.0001
	SP	77.79 <sub>b</sub>	≤ 0.0001

Altamente significativos  $P(\alpha \leq 0.01)$ .

La producción de AGV presenta diferencias altamente significativas  $P(\alpha \leq 0.01)$ , entre las tres materias primas evaluadas con sus interacciones CP y SP.

Morera fue la materia prima de mayor producción de AGV (76.75mm/litro), seguida de Torta de Soya (76.44mm/litro) y Maíz (71.46mm/litro), encontrándose diferencias altamente significativas entre ellas.

Las materias primas sin predigestión obtuvieron mejores producciones de AGV (76.54mm/litro) que las materias primas con predigestión (73.16mm/litro).

En la tabla 15 podemos ver claramente el perfil de ácidos grasos volátiles (Acido acético, propiónico, isobutírico, butírico, desconocidos y AGV totales) para cada una de las materias primas evaluados con sus interacciones (CP y SP en bovinos).

**Tabla 15.** Producción y Perfil de AGV para Morera, Maíz y Torta de Soya, con predigestión (CP) y sin predigestión (SP) a nivel ruminal.

ACIDOS GRASOS VOLATILES (%)							
ESPECIE	MATERIA PRIMA	PREDIGESTION CP/SP	Acido Acetico	Acido propionico	Acido Isobutirico	Acido Butirico	AGV TOTAL mm/litro
Bovinos	Morera	CP	56,98b	14,75bc	2,29a	8,04bc	64,80c
	Maiz		52,64c	15,98b	2,11a	14,22a	78,44a
	Torta de Soya		60,22a	19,21a	1,90b	8,51b	76,48b
	Morera	SP	53,99a	23,70	4,07a	7,92c	74,68c
	Maiz		53,56a	25,30	2,35b	15,17a	81,96a
	Torta de Soya		52,15ab	14,99	2,80b	8,46b	77,79b

La proporción de AGV varía con la dieta, aunque el producto más abundante es siempre el acetato. En una dieta alta en fibra, la proporción molar entre acético, propiónico y butírico es aproximadamente 70:20:10.1.

En la Tabla se observa con las materias primas SP, que la producción de Acido Acético fue similar para las tres materias.

En el caso del Acido Propiónico Maíz y Morera presentaron las mejores producciones de este acido.

La mayor producción de gas del Maíz esta asociada a sus mas altas concentraciones de acetato y butirato según Getachew *et al.* (1998), de igual manera los autores afirman que la fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del acido, por consiguiente, una menor producción de gas es asociada con la fermentación propiónica.

Acetato, propionato y butirato son los productos finales de la fermentación ruminal y no soportan producción microbiol adicional. El lactato provee aproximadamente la mitad de la cantidad de energía en la forma ATP como la glucosa para aquellos microbios que utilizan lactasa. Altas producciones de AGV como el Acido Propiónico conlleva a altas producciones de gas, y bajas concentraciones de AGV reflejan variaciones en la producción de acetato. Russell y Wallace (1988), citados por Hall (2000).

Esto es opuesto a lo citado por Getachew *et al.* (1998), aunque igualmente concuerda con los resultados encontrados en este trabajo, donde la mayor producción de gas la obtuvo el Maíz (113.04ml), quien a su vez presentó una alta concentración de Acido Propiónico.

En cuanto al Acido Butírico, las tres materias primas se comportaron diferentes, siendo Maíz la materia prima con mayor producción (15.17%), seguido de Torta de Soya (8.46%) y Morera con (7.92%). Esta tendencia es similar a la encontrada para monogástricos

Si se comparan los resultados anteriores de AGV para Maíz, Morera y Torta de Soya en su forma no predigerida para rumiantes, con la forma predigerida, vemos que en cuanto a la producción de Acido Acético, Torta de Soya CP tuvo la mayor proporción de este ácido (60.22%) y Morera fue la materia prima en su estado predigerido con la segunda mejor producción de Acido Acético.

Torta de Soya CP fue la materia prima con mejor producción de Acido Propiónico, seguida del Maíz y la Morera. Este comportamiento fue diferente comparado con las materias primas sin predigestión.

Para el caso de la producción de Acido Butírico de las materias primas CP, Maíz fue la materia prima con el porcentaje más alto de este ácido, seguido de Torta de Soya y Morera con (8.04%). Esta misma tendencia se dio en las materias primas SP.

En conclusión, la producción de AGV total fue mejor para Maíz SP, y menor en para Morera CP y SP. Como se mencionó anteriormente estos resultados podrían deberse a las altas producciones de Acido Propiónico, las cuales conllevan a altas producciones de gas y bajas concentraciones de AGV, que se ven reflejadas en las variaciones de la producción de acetato. Russell y Wallace (1988), citados por Hall (2000).

Las materias primas que contienen cantidades importantes de fibra podrían beneficiar el pH ruminal, maximizar la actividad celulolítica y favorecer la relación acetato:propionato. Belyea *et al.* (1989). Actualmente se reconoce la posibilidad de sustituir parte de los requerimientos de FDN que tradicionalmente se llenan con forrajes, mediante la incorporación de subproductos fibrosos. Firkins (1992), citado por Cruz y Sánchez (2008).

Zabaleta (2009), nos dice que en el rumen la producción de AGV depende de la composición de cada materia prima, de la actividad microbiana, del pH del medio y frecuentemente de la ingestión de las raciones a base de forraje, que de alimentos concentrados de alto contenido de proteínas o de carbohidratos altamente fermentables.

Procesos de fermentación ruminal deben producir los ácidos grasos en cantidades y proporciones adecuadas, lo cual se logra mediante el balance de las dietas por su contenido y calidad de carbohidratos. La cantidad y relación de los ácidos grasos volátiles pueden alterar el metabolismo y distribución de nutrimentos. Si la producción de ácido acético se ve disminuida con respecto al ácido propiónico, la producción de grasa se verá deprimida, mientras que si ocurre lo contrario la producción de glucosa se reduce, influyendo negativamente sobre el volumen de producción. Cruz y Sánchez (2008).

- **Degradación de Fibra Detergente Neutra FDN**

En la Tabla 16 se presentan las degradaciones de FDN de las tres materias primas utilizadas en este trabajo.

**Tabla 16.** Degradación de FDN para Morera, Maíz y Torta de Soya con predigestión y sin predigestión en bovinos.

MATERIA PRIMA	PREDIGESTION (CP / SP)	DEGRADACION	
		DE FDN (%)	Pr ≥ [t]
<b>Maíz</b>	CP	78.33 <sub>d</sub>	≤ 0.0001
	SP	90.10 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
<b>Morera</b>	CP	91.76 <sub>a</sub>	≤ 0.0001
	SP	86.05 <sub>b</sub>	≤ 0.0001
<b>Torta de Soya</b>	CP	82.68 <sub>c</sub>	≤ 0.0001
	SP	84.86 <sub>bc</sub>	≤ 0.0001

Altamente significativos  $P(\alpha \leq 0.01)$



La degradación de FDN presentó diferencias altamente significativas  $P(\alpha \leq 0.01)$ , entre las tres materias primas evaluadas con sus interacciones CP y SP.

Morera CP y Maíz SP son las materias primas que presentaron los mayores porcentajes de degradación de FDN (91.76% y 90.10 %) respectivamente, esto se podría explicar para el maíz por su buena producción de gas que se relaciona con mayor degradación de la fibra detergente neutra.

En cuanto a Morera, aunque no es la materia prima de mejor producción de gas, en la forma SP en la mayoría de los casos presentó mejor producciones de gas en los diferentes periodos y en las dos especies evaluadas.

Estudios realizados por Boschini (2006), quien determinó la degradación ruminal de la fibra detergente neutra en rebrotes de Morera a 70, 84, 98 y 112 días de edad encontró valores de FDN entre (63% y 73%), resultados que no coinciden con los encontrados en este trabajo de investigación. Claro esta que hay que tener en cuenta que estos resultados están ligados al factor digestibilidad.

La degradación de FDN fue superior en Morera (88.90%), seguido de Maíz (84.22%) y Torta de Soya (83.77%), no encontrándose diferencias estadísticas entre las materias primas ( $P > 0.05$ ), pero si fueron altamente significativas ( $P < 0.0001$ ).

La materias primas sin predigestión fueron mejores degradadoras de FDN que las materias primas predigeridas (87.00% y 84.26%).

La fibra juega un papel muy importante dentro de la alimentación de rumiantes, en general, el contenido de fibra en la dieta se asocia con la producción de carne o leche, por ejemplo, para ganado de leche el contenido de fibra en la dieta se asocia con la composición de la leche ya que por medio de su digestión se producen los principales precursores de la grasa láctea. Además, la calidad y cantidad de fibra consumida afectan la capacidad de consumo voluntario y la cantidad de energía que pueda aportar una ración. Así, la fibra tiene implicaciones importantes en las prácticas de alimentación de los rumiantes al afectar la salud, la producción y servir para estimar el contenido de energía de los forrajes y alimentos, así como el consumo voluntario. Weiss, (1993), citado por Cruz y Sánchez (2008).

La cantidad de FDN en la ración debe ser tal que no interfiera con el consumo de MS ni con la concentración energética de la dieta, ya que los alimentos fibrosos son menos energéticos que los granos. Grant (1991). La mayor parte de esta FDN en la dieta debe provenir de los forrajes. La FDN de los alimentos concentrados por lo general es más digestible que FDN del forraje

## 5. CONCLUSIONES

- Torta de Soya y Maíz fueron las materias primas que tuvieron mayor digestibilidad de Materia Seca, mientras que Morera tuvo el valor mas bajo de digestibilidad de materia seca en la prueba de digestibilidad *in vitro* en cerdos, debido probablemente a la presencia de fibra en la fuente alimenticia y en particular al contenido de lignina.
- Las materias primas con mayor cinética de producción de gas fueron aquellas que se incubaron en el tracto digestivo del cerdo, como en el rumen con predigestión (CP).
- Maíz CP y SP y Torta de Soya CP y SP, fueron las materias primas que presentaron mayores producciones de gas para cerdos y rumiantes, Morera CP y SP fue la materia prima que menor producción de gas presento en las dos especies.
- El intestino grueso y el rumen al recibir el mismos tipo de sustrato, es decir, sin predigerir, produce mas Ácidos Grasos Volátiles el rumiante, igualmente tiene una mejor degradación de Fibra Detergente Neutra, aunque la producción de gas es menor que en monogástricos.

- Cuando el rumen y el intestino grueso del cerdo se comparan recibiendo el sustrato predigerido, la producción de gas es mayor para monogástricos, mientras que la producción de Ácidos Grasos Volátiles y la degradación de Fibra Detergente Neutra es mejor para rumiantes.
- Con el sustrato en condiciones normales, predigerido para monogástricos, sin predigerir para rumiantes, el comportamiento fue mayor en cuanto a producción de gas se refiere, para monogástricos, mientras que para rumiantes se presentó más producción de Ácidos Grasos Volátiles y mejor degradación de Fibra Detergente Neutra.
- Las Materias Primas Sin Predigestión presentaron un mayor porcentaje de degradación de Fibra Detergente Neutra tanto para cerdos como para bovinos.
- El factor Con Predigestión o Sin Predigestión afectó notablemente la materia prima, por esto se hace necesario trabajarla en su estado normal dependiendo de la especie a evaluar.
- Altas curvas de producción de gas conllevaron a altas cinéticas de degradación, Bajas digestibilidades a mayores contenidos de FDN, cenizas y fibra dietética, y Altos volúmenes de gas tienen una relación directamente proporcional con el porcentaje de degradación de Fibra Detergente Neutra.

- Seguir evaluando el comportamiento de las materias primas se hace necesario para poder aprovecharlas de la mejor manera y correctamente como fuentes de alimento tanto para animales monogástricos como para rumiantes en nuestro país.
  
- Las técnicas *in vitro* son muy importantes para poder caracterizar los alimentos que utilizamos tanto en nuestro país como en el trópico para la alimentación de nuestros animales y cada vez cobran mas fuerza teniendo en cuenta el corto tiempo con que se pueden obtener resultados y sus bajos costos, sin embargo soy partidaria de hacer todas estas pruebas *in vivo* para mas exactitud de los resultados y la respuesta de los animales.

## BIBLIOGRAFÍA

ABREU, M.F.; SOARES, SM. Chemical composition, organic matter digestibility and gas production of nine legume grains. En: Anim Feed Scien Techn, 1997. (70), p. 49-57.

AIPLE, K.P.; STEINGASS, H.; MENKE, K.H. Suitability of a beffered faecal suspensión as the inoculum in the Hohenheim gas test. En: Journal of Animal Nutrition. Vol. 67.1992 p 57-66.

ALVAREZ NIVIA, Diana María. Evaluación in vitro de leguminosas tropicales como fuente de proteína para rumiantes. Tesis Zootecnísta. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 2000

BEEVER, D.E. Rumen function. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CAB International, Wallingford, UK. 1993 p 187-215.

BELYEA, R.L.; STEEVENS. B,J.; RESTREPO, R.J.; CLUBB, A.P. Variation in composition of by-product feeds. J. Dairy Sci. 72: 1989. p.2339-2345.

BLUMMEL, M.; BECKER, K. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. En: British Journal of Nutrition. 77: 1997 p. 757-768.

BLUMMEL, M.; GOMEZ, L.R.; CHEN, X.B.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K.; ORSKOV, E.R. The modification of an in vitro gas production test to detect roughage related differences in in vivo microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. En: Journal of Agricultural Science. 1999. 133: 335-340.

BLUMMEL, M.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. In vitro gas production: a technique revisited. En: Journal of Animal Physiology. 1997. 77:24-34.

BOISEN, S.; FERNANDEZ, J.A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. En: Animal Feed Science and Technology. Vol. 68; 1997 p. 277-286.

BONDI, A.A. Nutrición Animal en Rumiantes y Monogástricos. Editorial Acribia Zaragoza-España. 1989.

BOSCHINI, F.C. Nutrientes digeribles, energía neta y fracciones proteicas de la morera (*Morus alba*) aprovechables en vacas lecheras. Agronomía Mesoamericana 17(2): 2006. p. 141-150.

BOTERO, L., Julián Mauricio. Valor nutricional de forrajes arbustivos para cerdas adultas. Tesis Magíster en producción Animal Tropical. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2004.

BOUDRY, C.; ESTRADA, F.; SCHOELING, O.; FROIDMONT, E.; WAVREILLE, J.; BULDGEN, A. Interest of in vitro pre -digestion to estimate fermentability of feedstuffs in pig large intestine. 9th International Symposium on Digestive Physiology in pigs, Banff, Canada. Vol 2. 2003.

CAMPAGNA, D. Aprovechamiento de pasturas por cerdos en la etapa de crecimiento – terminación. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina. 2005. Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

CODEN, N. Metabolismo colónico de la fibra. Nutri. Hosp. XVII, (Sup. 2). 2002

CONE, J.W.; VAN, A.H.; VISSCHER, G.J.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. En: Animal Feed Science and Technology. 1996. 61: 113-128.

\_\_\_\_\_ Comparison of organic matter degradation in several feedstuffs in the rumen as determined with the nylon bag and gas production techniques. En: Animal Feed Science and Tecnology. Vol 96. 2002; p. 55–67.

CONE, J.W.; GELDER, A.H.; BACHMANN, H. Influence of inóculo source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. A. EAAP Satellite Symposium: Gas production: Fermentation Kinetics for feed evaluation and assess microbial activity. Wageningen Intenational Conference Centre. Wageningen. The Netherlands. 2000. P. 15-16.

CRUZ, M.; SANCHEZ, J. La fibra en la alimentación del Ganado lechero. Centro de investigaciones en nutricion animal (CINA). Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2008. Disponible en:  
<http://www.feednet.urc.ac.cr/bromatologia/bfagl.htm>.

CUNNINGHAM, J. Fisiología Veterinaria Interamericana Mc Graw-Hill. Mexico. 1995.



DIERICK, N.A.; VERVAEKE, J.J.; DEMEYER, D.I.; DECUYPERE, J.A. Approach to the energetics importance of fiber digestion in pigs. I. Importance of fermentation in the overall energy supply. *Animal Feed Sci. & Technol.* 1989. 23:141.

DUNG, N.N.X. et al. Tropical fiber sources for pigs-digestibility, digesta retention and estimation of fiber digestibility *in vitro*. *En: Animal Feed Science and Technology*. Vol. 95. 2002. p. 93-107.

EUN, J; FELLNER, V; and GUMPERTZ, M. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual – flow fermentors. American Dairy Science Association. *J. Dairy Sci.* Vol 87. Pág 112–121. 2004.

FONDEVILA, M.; NOGUEIRA, F.J.; BARRIOS, A. *In vitro* microbial fermentation and protein utilization of tropical forage legumes grown during the dry season. En: *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 95 (2002); p. 109-124.

\_\_\_\_\_ Microbial caecal fermentation in Iberic or Landrace pigs given acorn/sorghum or maize diets estimated *in vitro* using the gas production technique. En: *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 102 (2002); p. 93-107.

FRANCE, J.; SIDDON, RC. Volatil acids production. En: *Cuantitative aspect of ruminant digestion and metabolism.* (EDS J.M. FORBES and FRANCE). Pag. 107–121. 1993. (CAB International: Oxon, UK).

GARCIARENA, A.D.; VILLALBA S.E. Producción de gas *in vitro*. Estimación de la degradabilidad de los alimentos para rumiantes. Instituto Internacional de Tecnología Agropecuaria INTA EEA. C. Uruguay. Facultad de Bromatología UNER. 2002.

GETACHEW, G. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. En: Animal Feed Science and Technology. Vol. 72; 1998; p. 261–281.

GONSALVO, S.; NIEVES, D.; Ly, J.; MACIAS, M.; CARÓN, M.; MARTÍNEZ, V. Algunos aspectos del valor nutritivo de alimentos venezolanos destinados a animales monogástricos. Livestock Research for Rural Development, 2001.13(2): Disponible en: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd13/2/gonz132.htm>

GONZÁLEZ, C.; DÍAZ, I.; LEÓN, M.; VECCHIONACCE, H.; BLANCO, A.; Ly, J. Growth performance and carcass traits in pigs fed sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. L). Livestock. Research for Rural Development, 14(6): 2002. Disponible en: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd14/6/gonz146.htm>

GONZALEZ, D.A.; GONZALEZ, C. Jugo de caña de azúcar y follajes arbóreos en la alimentación no convencional del cerdo. Uso de follajes arbóreos como fuentes de proteína en dietas para cerdos. En: Revista computarizada de producción porcina. Vol 11.(numero 3). 2004 p. 25 – 38. Disponible en: <http://cipav.org.co/RevCubana/fullart/1103/110302.doc>.

GRANT, R. Evaluating the feeding value of fibrous feeds for dairy cattle. 1991. Disponible en: <http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/>

GRANT, R.J.; MERTENS, D.R. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. En: Journal of Dairy Science. 75: 1263-1272. 1992.

GROOT, J.C. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetic for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. En: Anim. Feed Sci. Technol. Vol 64. 1996. p. 77-89.

HALL.; M.B. Relevancia nutricional y análisis de los carbohidratos solubles – detergente neutro. Manual de laboratorio. Universidad de Florida. Boletín de extensión 339. 2000

HARINDER, P; MAKKAR. Recent advances in in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Monograph Publications. Joint FAO / IAEA DIVISION. Viena, Austria. 2004.

HARTEMIN, K.R.; VAN, L.K.; PEETERS, C.; NOUT, M.; ROMBOUTS, F. *In vitro* cariogenicity of trans galactosyl oligosaccharides. Lett Appl Microbiol (25), 38-42. Disponible en:  
<http://www.ceniap.gov.ve/pdf/revistascientificas/zootecniatropical/zt2501/pdf/medina%20m.pdf>.

HUNGATE, R E. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York. 1966. 533 p.

INFOAGRO. El Maíz: Todo acerca de El Cultivo del Maíz. 2007 Disponible en:  
<http://www.infoagro.com/herbaceas/cereales/maiz.asp>.

INFOAGRO. La soya: Panorama de la Cadena. 2007. Disponible En:  
<http://www.infoagro.gov.bo/soya/panorama/htm>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Tesis y otros trabajos de grado. Quinta actualización. Santafé de Bogotá D.C.: ICONTEC, 2007. 112p. NTC 1486.

JAURENA, R.A.; WAWRZKIEWICZ, M.; DANELÓN, J.L. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, UBA. 2006. Disponible En: <http://www.aapa.org.ar/congresos/2006/NaPdf/NA45.pdf>.

JUST, A.; JORGENSEN, H.; FERNANDEZ, J.A. The digestive capacity of the caecum-colon and the value of the nitrogen absorbed from the hind gut for protein synthesis in pigs. *Br. J. Nutr.* 1981. 46(1): pag 209-19.

LE GOFF G. and NOBLET J. Comparative digestibility of dietary energy and nutrients in growing pigs and adult sows. En: *J. Anim. Sci.* Vol. 79 (2001), p.2418-2427.

LEHNINGER A. Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Plató Barcelona. 1987.

LETERME P.; ESTRADA F. Notas de Laboratorio: Nutrición Animal. Universidad Nacional. Palmira, 2001

LINN, J.G.; MARTIN, N.P. Forage quality test and interpretation. *Feeding and Nutrition*. 1993. Disponible en: <http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/>

LOPEZ, GALEANO Anobio. Nutrición de Monogástricos. Apuntes de Clase teórica. Universidad Nacional de Colombia. 2005. Palmira.

LOPEZ, MOLINA Fredy Javier. Suplementación con Morera (*Morus alba*) de vacas Holstein en lactancia en la meseta de Popayán. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2005. Vol 3, No.1.

LÓPEZ, S.; CARRO, M.D.; GONZÁLEZ, J.S.; OVEJERO, F.J. Comparison of different *in vitro* and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. En: Animal Feed Science and Technology. 1998. 73: 99-113.

MAKKAR, Harinder. Recent advances *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. 2003.

\_\_\_\_\_ 2001. En: [http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570\\_EN\\_toc.htm](http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm).

MARTINEZ, SAÉZ., S., PEDRAZA OLIVERA R., LEÓN GONZÁLEZ, M., GONZÁLEZ PEREZ C.E y GUEVARA VIE G. 2005. Influence of the donor animal on the *in vitro* gas production with the use of voided bovine faeces. Livestock Research for Rural Development 17 (11) 2005. En: <http://www.lrrd.org/lrrd17/11/mart17129.htm>.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. En: Animal Feed Science and Technology. 1999. 79: 321-330.

MBUTHIA, E.; GACHUIRI, C. Effect of inclusión of macuna pruriens and dolichos lablab forage in napier grass silage on silage quality and on voluntary intake and digestibility in sheep. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 1: 123-128. 2003.

MEDINA, M.G.; GARCIA, D.E.; CLAVERO, T.; IGLESIAS, J.M.; LOPEZ, J.G. Evaluación inicial de la Morera (*Morus alba L.*) en condiciones de vivero. En: Zootecnia Tropical, 25(1):43-49. 2007.

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. En: Journal Agricultural Science. 1979. 93: 217-222.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. En: Anim. Res. Dev. Vol. 28 (1988); p. 7-55.

MERTENS, D.R. Nonstructural and structural carbohydrates. En: Large dairy herd management. H.H. Van Horn y C.J. Wilcox (Eds.). American Dairy Sci. Association. Ill. USA. 1992. p. 219-239.

NSAHLAI, I.V.; UMUNNA, N.N.; NEGASSA, D. The effect of multi-purpose tree digesta on *in vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. En: Journal of the Science of Food and Agriculture 1995; 69: 519-528

OPATPATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R.C.; LEAN I. J.; ANNISON, G.; KIRBY, A. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. Australian. Journal of Agricultural Research. 1994. 45: 1247-1263.

PAELMAN, D.S.; Danielson, D.M.; Grenshaw, M.A.; Pec, E.R. Long-term effects on dietary additions of alfalfa and tallow on sow reproductive performance. En: Journal. Anim. Sci. 1981, 51:294

PELL, A.N.; DOANE, P.H.; SCHOFIELD, P. *In vitro* digestibility and gas production. En: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG, 1997. p.109 - 132.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. En: Journal of Dairy Science. 1993. 76: 1063-1073

PENDONG, A.; BARBI, J.H.T.; OWEN, E.; DEAVILLE, E.R. Prediction of *in vivo* digestibility of forages using *in vitro* techniques: comparison of the two stage Tilley & Terry method with a gas production method. En: British Society of Animal Science. 1996.

POSADA, S.L.; NOGUERA, R.R. Técnica *in Vitro* de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. En: Livestock Research for Rural Development 17 (4) 2005. Medellín.

QUIRAMA, A.; CAICEDO, A. Determinación del valor nutricional de follaje de Bore, *Xanthosema sp*, Nacedero *Trichantera Gigantea*, y Morera *Morus Alba* en cerdos. Tesis de Grado (Zootecnia). Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2003.

RODRÍGUEZ, Z.; LÓPEZ, A.; BOUCOURT, R.; SAVON, L.; MADERA, M. Nivel y fuente de fibra en la dieta en la concentración y la actividad celulolíticas de la microbiota intestinal del cerdo. En: Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Tomo 3, No. 3. 2001. p. 269 – 275.

RODRÍGUEZ, Z.; LÓPEZ, A.; RIVERÍ, Z. Efecto del nivel de fibra en el número y la actividad celulolítica en el ciego de cerdos. En: Rev. cubana Cienc. agríc. 2000. 34:47

ROSALES, B.; JANNER, O. Manual Validación del método cromatográfico para el análisis de Acido Acético en Líquido Ruminal. Centro Internacional de Agricultura tropical CIAT. 2005. 15p.

ROSETO, J.R. Estudio químico, "*in situ*", "*in vitro*" e microscópico da parede celular de cinco génotipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. Ph. D. Thesis. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 2002. 148p.

ROYAL, C.F. Percentage of fermentable and non-fermentable fibers in corn fibers, beet pulp and FOS. 2003

Disponível em: <http://www.caninehealthnutrition.com/gsdigestive.pdf>.

RUIZ P., María Alejandra. Desarrollo de una metodología *in vitro* para estimar la tasa de fermentación de los forrajes en el intestino grueso del cerdo. Trabajo de grado (Magíster en Producción Animal Tropical). Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 2005. 118p.

SANCHEZ, M. Proteínas y vitaminas: procesos de fermentación. 2009. Disponível em: <http://www.monografias.com/trabajos/vitafemen/vitafermen.shtml>

SÁNCHEZ, M.D. Morera: un forraje excepcional disponible mundialmente. In: VI Seminario Internacional Sobre Sistemas Agropecuarios Sostenibles. FAO. Roma. 1999. Disponível em: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99/sanchezm.htm>

SARRIA B.P.; LETERME P.; LONDOÑO A.; BOTERO M. Valor nutricional de algunas forrajeras para la alimentación de monogástricos. Universidad Nacional de Colombia. 2006.

SAUVANT, D.; PEREZ, J.M.; TRAN, G. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Paris. 2002. 301p.



SCHOFIELD, P. Gas Production Methods. En: Farm Animal Metabolism and Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 2000. 450 p.

SCHOFIELD, P.; PELL, A.N. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. En: Journal of Dairy Science. 1995. 78: 2230-2238

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. En: Journal of Animal Science. 1994. 72: 2980-2991.

SILESHI, Z.; OWEN E.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K. Prediction of *in situ* rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an *in vitro* gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or *in vitro* digestibility. En: Animal Feed Science and Technology. 1996. 61: 73-87.

STANOGLIAS, G.; PEARCE, G.R. The digestion of fiber by pigs. 1. The effects of amount and type of fiber on apparent digestibility, nitrogen balance and rate of passage. En: British Journal of Nutrition. Vol. 53. 1985. p. 513-530.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J.A. simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. En: Animal Feed Science and Technology. 1994. 48: 185-197.

TORRES JARAMILLO, Julieta. Digestibilidad *in vitro* prececal y cecal de diferentes leguminosas tropicales para la nutrición en monogástricos Trabajo de grado Maestría en Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2009.

VAREL, V.H.; POND, W.G. Enumeration and activity of cellulolytic bacteria from gestating swine fed various levels of dietary fiber. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. 49: 858 – 862.

WILLIAMS, B.A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: *Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. En: *Journal of Dairy Science*. 2000. 43: 1452-1459.

WOOD, C.D.; MANYUCHI, B. Use of and *in vitro* gas production method to investigate interactions between veld hay and Napier hay or groundnut hay supplements. En: *Animal Feed Science Technology*. Vol. 67. 1997. p. 97-100.

ZABALETA, E. Los ácidos grasos volátiles. Fuente de energía en los rumiantes. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revista/CVvol1/CVv1c09.pdf>

ZARATE, T. Erika Geraldine. Ácidos grasos volátiles y urea en rumiantes. La Digestión Fermentativa de las proteínas. Nitrógeno. Urea. Posibles Problemas en la alimentación de Rumiantes. Trabajo de grado (Medica Veterinaria). Universidad Alas Peruanas. Perú. 2007.

## ANEXOS

### **ANEXO A. Método de digestibilidad *in vitro* de Boisen y Fernández, (1997)**

Este método consta de tres pasos:

#### **PASO 1. Simulación de la digestión ocurrida en el estomago.**

Se utilizan muestras de 0.5g de material molido (>1mm) en erlenmeyers de 100 ml con su blanco respectivo. Se añaden las soluciones fosfato buffer (0.1M pH 6.0), HCL 0.2M y se ajusta el pH a 2.0 con las soluciones de NaOH 1M o HCL 1M. Luego que estas muestras son agitadas se les agrega 1 ml de solución de pepsina la cual tiene que ser preparada en el momento, para prevenir el crecimiento bacterial se le agregan 0.5 ml de la solución cloranfenicol. Por ultimo los erlenmeyers se tapan con tapón de caucho y se colocan en un agitador magnético múltiple durante dos horas, dentro de una cámara con temperatura manejada termostáticamente a 39°C. Boisen y Fernandez, (1997).

#### **PASO 2. Simulación de la digestión ocurrida en el intestino delgado.**

A la mezcla anterior se le adiciona una solución fosfato buffer (0.2M, pH 6.8) y una solución de NaOH 0.6M, el pH se ajusta a 6.8 y se adiciona 1ml de solución pancreatina, esta con el fin de mezclar los sedimentos. El material no disuelto se remueve gracias a la previa centrifugación. Por último los erlenmeyers son incubados bajo continua agitación magnética a 39°C durante un periodo de 4 horas. Boisen y Fernandez, (1997).

### **PASO 3. Simula la digestión ocurrida en el intestino grueso.**

A cada erlenmeyer se le agrega una solución EDTA 0.2M, su pH se ajusta a 4.8 con ácido acético 30% y sus sedimentos son mezclados cuidadosamente con 0.5ml de una mezcla de un complejo multienzimático. Después se tapan los erlenmeyers con un tapón de caucho y se incuban con agitación magnética a 39°C durante 18 horas. Los residuos que no se digieren se recuperan con filtración usando crisoles de vidrios secos y previamente pesados. Todo el material se transfiere a un crisol, se lava con etanol al 96% y acetona al 99.5% y los residuos no digeridos se secan a 130°C hasta obtener un peso constante. Por último se obtienen las cenizas colocándolos a 500°C durante 4 horas. Boisen y Fernandez, (1997).