

**CEN'RO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACIÓN y
DESARROLLO, A.C.**

**Producción de Gas en Fermentaciones de Grano de Trigo como
Indicador de la Digestión en Rumiantes**

Por

I.B. Fanny Olivia Reveles Saucedo

TESIS APLICADA A LA
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

FEBRERO DEL 2002

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Inocencio Higuera Ciapara
Director General

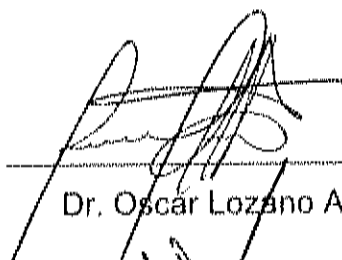
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Fanny Olivia Reveles Saucedo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

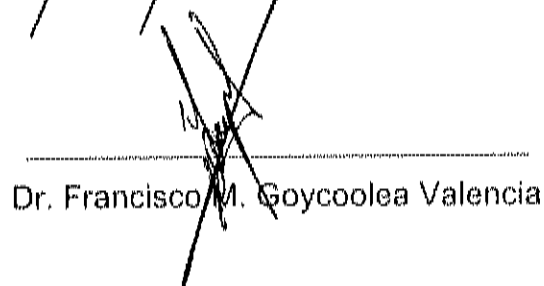


Dr. Francisco Ysunza Breña

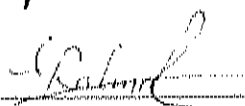
Director de Tesis



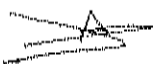
Dr. Oscar Lozano Ascencio



Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia



Dra. Alma Rosa Islas Rubio



Dr. Jesús Hernández López

DEDICATORIA

*A la vida misma que me ha permitido disfrutarla durante todo este trayecto,
recontrándome a mi misma.*

*A mis padres Rubén Revelés Valdéz y Sabina Saucedo Nevárez, quienes siempre
han estado cerca de mí a pesar de la distancia geográfica, apoyándome y
enriqueciéndome con su amor, confianza, fortaleza y los mejores deseos.*

A mis hermanos Heraclio y Liliana, mis bellos complementos.

*A mi tía Yolanda por su presencia siempre tan positiva y fresca, siempre ella
misma, nadie más igual en este mundo.*

*A mis muy queridos Abuelito Jesús, Tía Mela y Tía Hortensia, amores que
siguen significando mucho para mí.*

*A mi querida abuelita cada vez más bella por dentro y por fuera al paso de los
años. Siempre dándose a sus seres queridos sin juzgar a quien.*

*A mi tía Tina y su esposo tío José Luis ejemplos del amor, confianza y respeto
mutuo.*

*A mis tíos y primos que siempre han estado al pendiente de mí, deseándome lo
mejor, apoyándome de una u otra forma para lograr mis metas: tío Aurelio, tío Goyo,
tío Beto, tía Sofía, tía Martha Olivia, Karla y Brenda Hdez. R, Marthita, Gaby, Luis,
Lalo y Jairo Betancourt S., Gaby, Tanys, Mauricio y Vero Aguilera R,*

*A dos seres maravillosos, Doña Socorrillo y Don Héctor, vivos ejemplos de amor,
fe, esperanza y lucha.*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) – Hillo, por la oportunidad de crecer profesionalmente dentro de sus instalaciones durante mis estudios de Maestría en Ciencias en la Dirección de Nutrición.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante los dos primeros años de mis estudios de posgrado.

Con cariño, admiración y respeto al director de mi tesis: Dr. J. Francisco Ysunza Breña por su oportuna y beneficiosa asesoría en todo lo requerido y por su gran capacidad profesional y humana, quedando orgullosa de haber sido su tesista.

Con cariño, admiración y respeto al Dr. Juan Pedro Camou por su incomparable labor como Coordinador de Docencia aunado a su gran calidad como ser humano.

Al comité de tesis: Dr. Jesús Hernández López, Dra. Alma Rosa Islas Rubio, Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia y Dr. Oscar Lozano Ascencio por sus comentarios, observaciones y sugerencias que enriquecieron el presente trabajo.

Al excelente apoyo técnico de la Q.F.B. Diana Mendoza e Ing. Hernán Celaya.

Al buen trabajo en equipo y correspondiente amistad de mis compañeros de Nutrición Animal Yolanda López Franco y Jorge A. Muñoz Campa.

De una manera particular a Julián Esparza, Erika Javier Sainz, Luis Robles, Adriana Bolaños, Andrés Beltrán, Helio Alemán, Martín Peralta, Aracely Angulo y compañeros de generación, especialmente Gris, Ely y Marina.

A todas y cada una de las personas que de alguna u otra forma colaboraron en mi trabajo de tesis brindándome su confianza y respeto.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Alimentos Altamente Energéticos	4
Digestibilidad	6
Digestión en el Rumen	7
Técnicas para la Medición de Digestión en Rumiantes.....	9
Digestión <i>in Vivo</i>	9
Digestión <i>in Situ</i>	10
Digestión <i>in Vitro</i>	11
Técnica de Tilley y Terry	11
Técnica de producción de gas.....	13
Balance de la fermentación.....	13
Avances de la técnica de producción de gas como indicador de la Velocidad de digestión..	14
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Animales	20
Material a Evaluar	20
Técnicas de Digestión.....	21
Digestión <i>in Vitro</i>	21
Reactivos	21
Preparación de la solución amortiguadora de McDougall	22

ÍNDICE (Continuación)

	Página
Obtención del líquido ruminal	22
Preparación del inóculo	22
Digestión <i>in Situ</i>	23
Producción de Gas.....	24
Reactivos	24
Mediciones de producción de gas	25
Construcción de Curvas de Cinética de Digestión	27
Valores Estimados de Velocidad de Digestión	28
Análisis de los Datos.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Técnica de Producción de Gas	29
Técnicas de Digestión <i>In Vitro</i> , <i>In Situ</i> y Producción de Gas.....	34
Curvas de Cinética de Digestión	40
Valores Estimados de Digestión	46
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Valores Promedio de Desaparición de Materia Orgánica (%) <i>In Vitro</i> ..	37
2. Valores Promedio de Desaparición de Materia Orgánica (%) <i>In Situ</i> ...	37
3. Tiempo Promedio (h) de Fermentación al Momento de Registrarse los Incrementos de Producción de Gas que Alcanzaron Diferenciales Equivalentes a 7.0 mV con Respecto a la Presión Atmosférica	38
4. Velocidades de Digestión 0-12 h de Grano de Trigo	41
5. Velocidades de Digestión 0-36 h de Grano de Trigo	41
6. Comparación Entre las Estimaciones de Desaparición de Material (<i>in Vitro</i> e <i>in Situ</i>) y la Producción de Gas.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Medición de producción de gas	27
2. Pruebas preliminares de medición de producción de gas en fermentaciones con la misma muestra aleatoria a diferentes tiempos de incubación	31
3. Modelos lineales de desaparición de materia orgánica <i>in vitro</i> (ya), <i>in situ</i> (yb) e incrementos de producción de gas (yc) a 12 horas para trigo con diferentes procesamientos.....	44
4. Modelos logarítmicos de desaparición de materia orgánica <i>in vitro</i> (ya), <i>in situ</i> (yb) e incrementos de producción de gas (yc) a 36 horas para trigo con diferentes procesamientos.....	45
5. Relación de las estimaciones de digestión hasta las 12 h (lineal 0-12 h) obtenidas por la técnica de producción de gas con respecto a las técnicas de desaparición <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	47
6. Relación de las estimaciones de digestión hasta las 36 h (logarítmico 0-36 h) obtenidas por la técnica de producción de gas con respecto a las técnicas de desaparición <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	48

RESUMEN

En la ganadería resulta básico el mejoramiento del comportamiento productivo animal a partir de la utilización de los ingredientes dietarios. Un indicador de este comportamiento es la velocidad de digestión de nutrimentos. Para estimarla existen técnicas in vivo, in situ e in vitro. Entre las técnicas in vitro, la producción de gas (PG) presenta ventajas sobre las demás. Ésta técnica consiste en estudiar la acumulación de gas producido durante la fermentación anaeróbica del alimento por microorganismos ruminales. La liberación de gas es relacionada a la degradación, proporcionando información indirecta acerca de la cantidad de productos de fermentación disponibles para el animal. Es necesario evaluar la técnica de PG para determinar la velocidad de digestión de alimentos rápidamente fermentables por los microorganismos ruminales. El objetivo del trabajo fue evaluar la PG como indicador viable de la digestión de granos de trigo: crudo, acondicionado 1,2 y rolo. Paralelamente se corrieron digestiones utilizando las técnicas tradicionales in situ e in vitro. Con los resultados se construyeron curvas de cinética de digestión de cada muestra en cada técnica. En la PG éstas se obtuvieron al graficar el número de veces que la presión de gas alcanzó diferenciales equivalentes a 7.0 mV contra el tiempo de fermentación en que ocurrió cada uno; in vitro e in situ se graficó la desaparición de materia orgánica (% MO). Las curvas de cinética se ajustaron a modelos de regresión lineal y logarítmica para la velocidad de digestión inicial a 12 h y completa a 36 h, respectivamente. Los datos fueron analizados en el paquete estadístico NCSS 6.0 siendo el procesamiento y la técnica los efectos principales. De las muestras evaluadas, el grano de trigo rolo tuvo la producción de gas más baja y lenta con 0.95 incrementos de gas/h. Resultado similar se obtuvo con la técnica in vitro, donde el trigo rolo presentó la menor velocidad de digestión inicial (2.99%, MO/h). En cambio, con la técnica in situ este grano alcanzó la mayor velocidad inicial (3.07% MO/h).

A diferencia de *in*.....

in vitro e *in situ*, con la PG se obtuvieron el doble de lecturas dentro de este periodo de tiempo (12 h) escribiendo mejor la etapa Inicial de digestión. Ninguna de las técnicas indicaron diferencias de velocidad de digestión inicial. Después de 36 h de incubación, el trigo roado continuó mostrando la velocidad de digestión mas lenta por las técnicas de PG (127.95 incrementos de gas/l) e *in vitro* (19.87% MO/h), mientras que *in situ* presentó la digestión máxima más alta (121.88% MO/h) y diferente ($p=0.0006$) al trigo crudo (112.43% MO/h) y acondicionados (11.404% MO/h). Las estimaciones de PG que habria 11 momento de la digestión máxima obtenida *in vitro* e *in situ*, fueron graficadas para la digestión inicial y la digestión completa. Durante las primeras 12 h de fermentación la relación de PG vs *in vitro* (0.43) resultó mayor y diferente ($p=0.036$) con respecto a *in situ* (0.33). A 36 h de digestión se encontró la 111isma tendencia pero con una menor significancia ($p=0.15$). No obstant'h, la comparación de PG con *in vitro* fue casi igual a 1 (0.98) Indicando su 111ejor relación que con *in situ* (0.69), La PG acumulada medida por incrementos de presión prEide!erminados es una alternativa viable para la construcción de curvas de cinética de digestión. La tasa d, digestión inicial de granos rápidamente fermentables mediante un modelo lineal de PG resultó rnás adecuado quú las técnicas tradicionales mientras que la predicción de digestión a 36 h se comportó de manera similar a la obtenida por la técnica *in vitro* tradicional.

INTRODUCCIÓN

En la ganadería, la utilización adecuada de los ingredientes dietarios ha permitido el mejoramiento del comportamiento productivo. Un indicador de este comportamiento es la estimación de la velocidad de digestión de nutrimentos. Las técnicas utilizadas para la medición de ésta pueden realizarse *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

Los estudios de digestión *in vivo* están sujetos a errores asociados con el uso de marcadores de flujo microbiano y digesta, así como a variaciones inherentes al animal donde las contribuciones endógenas son difíciles de medir. Es conveniente el uso de otras técnicas que proporcionen una estimación de la digestión de nutrimentos con menor variación. Entre los métodos alternativos la técnica de digestión *in situ* es muy utilizada debido al bajo costo y simplicidad en su ejecución. Sin embargo, factores relacionados con el material y manejo de la bolsa, la muestra, los microorganismos ruminales y dieta del animal afectan las estimaciones de velocidad de digestión. Otras alternativas son los sistemas de digestión *in vitro*, siendo tradicionalmente utilizada, la técnica de Tilley y Terry. La acumulación de productos finales de fermentación y la dieta del animal donador interfieren en la interpretación de resultados. Al igual que en las pruebas *in situ*, los análisis del alimento son destructivos y requieren de una muestra para cada intervalo de tiempo. Además la fase inicial de la cinética de digestión es difícil de estudiar, presentando poca reproducibilidad. Estas

desventajas han fomentado el empleo de otros métodos potenciales *in vitro*, entre los que resalta la medición de producción de gas.

En este método las mediciones son hechas a partir de la estimación indirecta del sustrato fermentado, mediante el monitoreo de la acumulación de gases por la fermentación anaerobia del alimento. Desde hace algunas décadas se han incluido a la metodología avances tecnológicos tales como manómetros de agua calibrados, jeringas, LED's (lux emitter diodes), sensores y transductores de presión, válvulas electrónicas y la automatización del equipo, mejorando continuamente la precisión y exactitud de la técnica para aplicarla en un mayor número de alimentos. A diferencia de las técnicas tradicionales *in situ* e *in vitro*, la producción de gas permite una mejor descripción de la fase inicial de fermentación y la toma de lecturas en cada intervalo de tiempo sobre la misma muestra sin necesidad de manipularla ni destruirla. Sin embargo, los estudios realizados principalmente en materiales fibrosos, conducen a seguir evaluando la medición de producción de gas para determinar la velocidad de digestión de concentrados rápidamente fermentables, como los granos de cereales.

La digestibilidad de cereales varía de acuerdo al tipo de grano y procesamiento al que fue sometido. Dependiendo de lo anterior, el tiempo que los granos permanecen dentro del rumen podría ser insuficiente para que éstos se digieran completamente, siendo la velocidad de paso el limitante para su digestión total. Si el grano presenta una muy alta velocidad inicial de digestión,

puede inducir una disminución severa del pH ruminal reduciendo la actividad de la población bacteriana y el comportamiento productivo. Ésto es importante en granos rápidamente fermentables como el trigo. La determinación de la velocidad de digestión del grano bajo estudio permite predecir en qué condiciones de procesamiento será mejor aprovechado por el animal sin ocasionarle trastornos digestivos.

La medición de producción de gas *in vitro* puede generar información valiosa acerca de la velocidad de digestión de este tipo de alimento en rumiantes. Por ello, se planteó como objetivo general evaluar la técnica de producción de gas como indicador viable de la digestión de granos de trigo con diferente procesamiento. Siendo los objetivos específicos: establecer la técnica de producción de gas para muestras de granos, medir y comparar la tasa de digestión de grano de trigo por los métodos de producción de gas, *in vitro* tradicional e *in situ*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Alimentos Altamente Energéticos

La necesidad de aumentar la eficiencia del comportamiento productivo animal ha estimulado el interés en optimizar el valor nutricional de los ingredientes dietarios (Axe *et al.*, 1987). El crecimiento es más eficiente en rumiantes con dietas concentradas que en aquellas dietas a base de forrajes. Entre los alimentos que aumentan el consumo de energía, es decir, dietas concentradas, se encuentran el cebo, los aceites, las melazas y varios granos de cereales. La energía de estos alimentos es derivada principalmente por su contenido en grasa o por la cantidad de hidratos de carbono presentes (Church, 1978).

Los granos de cereales son producidos por plantas de la familia Gramineae. Entre estos granos se encuentra el maíz, el sorgo, la avena, la cebada, el centeno y el trigo (Church, 1978). Debido a que los granos de cereales intactos serían poco digestibles dentro del rumen, su disrupción por la masticación es el factor dominante que determina la velocidad y la extensión a la que estos alimentos serán digeridos. Algunos procesamientos en los granos de cereales son requeridos para estimular su adecuada digestión y eficiente utilización por el ganado al incrementar la energía disponible (Beauchemin *et al.*, 1994; Owens *et al.*, 1997). Sin embargo, el costo y el beneficio potencial del

procesamiento dependen tanto del tipo de grano como del método seleccionado (Beauchemin *et al.*, 1994).

El almidón representa hasta un 80% de la mayoría de los granos de cereales y es frecuentemente la principal fuente de energía en las dietas de rumiantes (Waldo, 1973; Huntington, 1997). Dependiendo de la eficiente utilización del almidón por el animal, se promueve una mayor producción (Santos *et al.*, 1997). El almidón es sujeto a la fermentación microbiana en la cavidad ruminal y posteriormente, a la digestión enzimática en el intestino delgado produciendo glucosa (Waldo, 1973). La proporción de almidón digerida en el rumen o intestino ejerce un efecto sobre la calidad y cantidad de nutrimentos utilizables para el animal (Philippeau y Deschault, 1999). En el rumen, los hidratos de carbono son la mayor fuente de energía para el crecimiento microbiano. Los ácidos grasos volátiles (AGV) resultantes de la fermentación microbiana son la fuente primaria de energía para el metabolismo animal, aunque también los lípidos y los aminoácidos pueden utilizarse como fuentes de energía (Nocek, 1988).

Aunque el almidón en granos de cereales es casi completamente digerido a lo largo del tracto digestivo del animal, la tasa y extensión de la fermentación ruminal varía con la fuente de grano y el procesamiento del cereal (Philippeau *et al.*, 1999). La tasa y extensión de la fermentación del trigo y de la cebada son mayores que aquellas del sorgo o maíz. Entre 80-90% del almidón de la cebada y del trigo es digerido dentro del rumen, mientras que solo del 55

al 70% para el sorgo y el maíz (Cheng *et al.*, 1998). Se considera que la digestibilidad del trigo crudo es del 65-75% y con el procesamiento aumenta hasta 85 y 90% (Mathison, 1996) mejorando sustancialmente su valor nutritivo (Kreikemeier *et al.*, 1990). Cuando el ganado sobre consume hidratos de carbono rápidamente fermentables, como son azúcares y almidón presentes en los granos de cereales (Shimada, 1983) pueden ocurrir condiciones de acidosis al incrementarse rápidamente la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos ruminales, reduciéndose el pH ruminal (Fulton *et al.*, 1979; Kreikemeier *et al.*, 1987; Glock y DeGroot, 1998). En consecuencia se disminuye la ingesta, la motilidad ruminal, la fermentación y la absorción de nutrimentos, afectando el comportamiento productivo (Kreikemeier *et al.*, 1987; Burrin *et al.*, 1988; Bauer *et al.*, 1995).

Digestibilidad

La composición química de un alimento puede indicar el contenido de nutrimentos, mas no su disponibilidad para el animal, por lo que es necesario contar con datos de digestibilidad. La digestibilidad se define como el porcentaje de un nutrimento que es digerido durante su paso por el tubo gastrointestinal. La digestibilidad varía de acuerdo a factores propios del alimento y/o por efecto de los animales que lo consumen. En general, la digestibilidad de los granos de cereales y otras fuentes de azúcares o almidones es elevada para todas las especies de animales de granja. La disponibilidad digestiva de los

alimentos puede ser manipulada mediante procesos como son el molido, el peletizado ó el hojueleado que en general, aumentan la velocidad a la que pasa el alimento por el tubo gastro-intestinal. Aunque dicho efecto disminuye ligeramente la digestibilidad, esto se compensa con un mayor consumo del alimento que a su vez redundan en una mejor respuesta animal (Shimada, 1983).

Los métodos para medir la digestibilidad implican el manejo de animales, por lo tanto resultan costosos en cuanto a tiempo, mano de obra calificada y número de análisis químicos. Se han desarrollado métodos alternos más rápidos, fáciles de efectuar y baratos, aunque presentan mayores posibilidades de error (Shimada, 1983).

Digestión en el Rumen

El sistema del rumen constituye un medio de cultivo para la gran población de microorganismos que habitan en él. Éstos se multiplican mediante la utilización de los alimentos ingeridos por el rumiante en una mezcla acuosa a la que contribuyen sales importantes como las de la saliva (De Alba *et al.*, 1983). El compartimiento ruminal actúa como una cámara de fermentación predominantemente anaeróbica, con un pH que varía entre 5.5 y 7.0 de acuerdo al tipo de alimento consumido (Ensminger *et al.*, 1991) y al tiempo en que se realiza la medición; presenta una temperatura de 39 ± 1 °C producto de la fermentación microbiana y del metabolismo corporal. La típica atmósfera

ruminal está compuesta de bióxido de carbono (60-70%), metano (30-40%), nitrógeno (7%), oxígeno (0.6%), hidrógeno (0.2%) y ácido sulfhídrico (0.01%). Es una fuente continua de sustrato (alimento, saliva, metabolitos microbianos, etc.) con una continua remoción de productos durante los procesos de crecimiento microbiano, eructo, absorción de los nutrimentos, paso a otros compartimentos de residuos no digeridos (Shimada, 1983).

En el rumen continuamente existe una masa de partículas en proceso de digestión microbiana. Se calcula que cerca de la tercera parte de los microorganismos se encuentran libres en el líquido ruminal, empleando y metabolizando con rapidez los materiales en solución, ya sea de origen alimenticio, endógeno ó microbiano (Shimada, 1983). La distribución de la población microbiana ruminal esta determinada por la composición del alimento y por la cantidad relativa de sustratos disponibles, dominando los organismos con la capacidad enzimática para hacer frente a sustratos específicos (Van Soest, 1983). La presencia de los microorganismos en el rumen es lo que permite al bovino la digestión de hidratos de carbono complejos (celulosa, hemicelulosa, pectina), el aprovechamiento de nitrógeno no proteico para su conversión en aminoácidos y en proteínas, la síntesis de la mayoría de las vitaminas hidrosolubles, la producción y posterior utilización de ácidos grasos de cadena corta como fuentes de energía metabolizable, entre otras funciones (Shimada, 1983).

Técnicas para la Medición de Digestión en Rumiantes

La digestión total en rumiantes está dada por la velocidad de digestión que se refiere a la fracción de alimento digerido por unidad de tiempo, y por la velocidad de paso de residuos no digeridos que indica el tiempo de residencia del alimento en digestión a lo largo del tracto digestivo (Van Soest, 1983). El número de técnicas utilizadas para evaluar la digestión de los alimentos en rumiantes es variado. Estas técnicas se pueden desarrollar *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

Digestión *in Vivo*

Existen varios métodos para la medición de la digestibilidad. Éstos en general consisten en proporcionar al animal cantidades predeterminadas de un alimento de composición conocida, medir y analizar las heces (Shimada, 1983; McDonald *et al.*, 1984). Las mediciones de digestión de nutrientes *in vivo* en el rumen e intestino delgado requieren animales quirúrgicamente preparados con cánulas en el rumen, abomaso o duodeno e íleon. También es necesario el uso de marcadores compatibles (insolubles durante el proceso de digestión que se adicionan junto con la dieta del animal) para calcular la velocidad del flujo de la digesta así como diferenciar entre el flujo microbiano y el flujo de nutrientes hacia el intestino delgado (Stern *et al.*, 1997).

En los estudios *in vivo*, las contribuciones endógenas de los nutrimentos son difíciles de medir, pero éstas deben evaluarse para obtener valores exactos de digestión; sin embargo estos datos son limitados. La medición de digestión de nutrimentos *in vivo* es costosa, de trabajo intensivo, está sujeta a errores asociados con el uso de marcadores de velocidad del flujo de la digesta, marcadores microbianos y variaciones inherentes al animal (Stern *et al.*, 1997). De ahí la conveniencia de usar técnicas alternativas que, aunque solamente proporcionan una estimación de la digestión de nutrimentos *in vivo*, sí permiten un mayor control de las variables durante su ejecución. Entre ellas, las técnicas realizadas *in situ* e *in vitro*.

Digestión *in Situ*

Un método alternativo es la técnica de digestión *in situ*, considerada como la base en la predicción de digestión de algunos sistemas de alimentación (Nocek, 1988). La técnica involucra suspender bolsas de dacrón ó nylon, conteniendo el alimento bajo estudio, dentro del rumen de animales canulados; posteriormente se extraen a intervalos variables de tiempo, recuperándose los residuos para determinar la desaparición del nutrimento a evaluar. Lo anterior representa una ventaja respecto a otros métodos de laboratorio debido a que involucra procesos digestivos que ocurren en el rumen de un animal vivo (Stern *et al.*, 1997).

Sin embargo, varios factores afectan las estimaciones de la digestión de nutrimentos y necesitan ser controlados para estandarizar la técnica. Estos

factores incluyen la porosidad del material de la bolsa, la colocación de la misma dentro del rumen, así como residuos remanentes en ella al terminar la incubación. Otros factores son el peso y talla de la partícula de la muestra, grado de ataque y colonización bacteriana a los residuos dentro de la bolsa, la dieta y la frecuencia de alimentación del animal (Nocek, 1988; Stern *et al.*, 1997). Además solamente un número limitado de muestras puede ser evaluado en cada intervalo de tiempo de incubación. Lo anterior sugiere que la técnica *in situ* no es aplicable óptimamente a todos los alimentos (Mauricio *et al.*, 1999).

Digestión *in Vitro*

Algunos investigadores consideran que las técnicas para estimar la digestión de alimentos *in vitro* son las más correlacionadas con la digestión *in vivo* (Cherney *et al.*, 1993). Estas técnicas pretenden simular los procesos de digestión que ocurren en el rumiante al incubar muestras de alimento en un medio apropiado con enzimas digestivas como pepsina y/o tripsina, celulasa o fluido ruminal, durante un periodo fijo de incubación. La digestibilidad es derivada a partir de la desaparición de materia seca del alimento evaluado (Beuvink y Spoelstra, 1992).

Técnica de Tilley y Terry. La técnica *in vitro* tradicionalmente utilizada es la descrita en 1963 por Tilley y Terry. Ésta se ha establecido como un adecuado indicador de la desaparición de materia seca *in vivo* de forrajes (Valdes y Jones, 1987) sirviendo también como una herramienta de selección

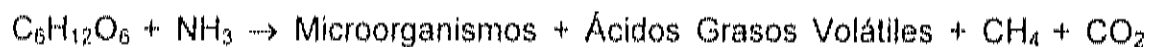
para mejorar sus cualidades nutricionales. El inóculo ruminal es típicamente filtrado a través de varias capas de gasa y diluido en solución salina, saliva artificial, o varias soluciones amortiguadoras para mantener el estudio en condiciones de anaerobiosis. La estandarización de esta técnica de digestión depende de varios aspectos en los que se incluyen dilución del inóculo ruminal, tipo de sustancia amortiguadora, tamaño de la partícula de la muestra y tipo de dieta del animal donador (Stern *et al.*, 1997).

Uno de los mayores problemas con las técnicas de fermentación *in vitro* es la variación entre experimentos, principalmente debida al inóculo o a su fuente (Johnson *et al.*, 1958; Cherney *et al.*, 1993). La acumulación de productos finales de fermentación y la dieta del animal donador (Cherney *et al.*, 1993) interfieren en la interpretación de los resultados (Varel y Krekemeier, 1995). Al igual que en las pruebas *in situ*, los análisis del alimento destruyen la muestra, requiriéndose una muestra para cada intervalo de tiempo. Por lo tanto, los estudios de cinética de digestión son prolongados y con poca reproducibilidad. Como las pérdidas de peso correspondientes a las etapas iniciales de digestión son pequeñas, esta fase de la cinética de digestión es difícil de estudiar. Estas desventajas del método *in vitro* tradicional han propiciado la búsqueda y aplicación de otros métodos potenciales *in vitro*, como por ejemplo, aquellos procedimientos basados en digestiones enzimáticas, en fermentaciones continuas de cultivos, en la solubilidad del nitrógeno ó en la

fragmentación de proteínas; entre estos métodos destaca la medición de producción de gas (Stern *et al.*, 1997).

Técnica de producción de gas. Hay reportes que demuestran que la medición de producción de gas de las incubaciones de forrajes con líquido ruminal, pueden predecir la digestibilidad y valor energético de un amplio rango de alimentos (Beuvink y Spoelstra, 1992; Pell y Schofield, 1993; Pell *et al.*, 1999; Nagadi *et al.*, 2000^b). En este método las mediciones son a partir de la estimación indirecta del sustrato fermentado en vez de la desaparición de materia seca, como sucede en las técnicas tradicionalmente utilizadas *in vitro* (Tilley y Terry) e *in situ* (Iantcheva *et al.*, 1999).

Balance de la fermentación. El principio teórico de la medición de producción de gas como indicador de la velocidad de digestión de un alimento es el balance de la fermentación microbiana ruminal (Stern *et al.*, 1997). Una característica esencial de los sistemas anaerobios (como es el caso particular de la cavidad ruminal) es que cumplen con las reglas estequiométricas del balance químico, donde los productos finales de la fermentación son derivados a partir del sustrato. Lo anterior puede ser establecido en forma de ecuación:



donde se asume que a partir del alimento ingerido por el rumiante, sustratos tales como hidratos de carbono y amonio pueden ser reducidos a sus equivalentes mediante la digestión anaerobia por los microorganismos ruminales, generándose masa microbiana, ácidos grasos volátiles, siendo el

bióxido de carbono y metano los principales componentes del gas producido durante la fermentación. A partir de la ecuación se ha visto que un cambio en la cantidad de cualquier producto resultará en un balance alterado de los demás productos (Van Soest, 1993; Stern *et al.*, 1997).

Avances de la técnica de producción de gas como indicador de la velocidad de digestión. Varios investigadores han trabajado con la técnica de medición de producción de gas, entre los cuales Trei *et al.* (1970) estudiaron el efecto del procesamiento sobre la digestión de granos por microorganismos ruminales, midiendo el volumen del fluido desplazado por el gas producido en manómetros de agua calibrados, conectados a frascos con inóculo. En un trabajo realizado por Menke *et al.* (Theodorou *et al.*, 1994) se midió volumétricamente la producción de gas utilizando jeringas calibradas (100 ml de capacidad) conteniendo el sustrato a digerir en un medio de cultivo inoculado con líquido ruminal. La tasa de fermentación la determinaron al registrar en diferentes intervalos de tiempo el desplazamiento del émbolo de la jeringa causado por los gases producidos. A pesar de la sencillez, este procedimiento no ha sido ampliamente utilizado en las evaluaciones de digestibilidad de forrajes debido a los problemas con la manipulación de la jeringa (Theodorou *et al.*, 1994) ya que son estrechas y se dificulta colocar en ellas cantidades mayores de 500 mg de muestra (Getachew *et al.*, 1998). Se ha observado que en los alimentos con una tasa de producción de gas baja, se puede tener una

mayor digestibilidad *in vivo* que la sugerida a partir de los datos de producción de gas (Mauricio *et al.*, 1999).

Con el objeto de obtener mediciones de producción de gas más exactas, precisas y sensibles, en 1991, Theodorou *et al.* usaron LED's (lux emitter diodes) y un transductor de presión. Estos implementos electrónicos, se conectaron a un ensamble compuesto por el émbolo de una jeringa de plástico (5-60 ml de capacidad) y por una aguja de metal hipodérmica, la cual insertaron manualmente dentro de frascos en incubación para cada una de las mediciones de presión del gas producido durante diferentes intervalos de tiempo por las fermentaciones anaerobias de forrajes (Pell y Schofield 1993; Theodorou *et al.*, 1994). Posteriormente, Pell y Schofield (1993) describieron una metodología computarizada de producción de gas con la que pretendieron facilitar los estudios de cinética de digestión de forrajes *in vitro*. En este trabajo se utilizaron sensores individuales de presión para el monitoreo de los productos gaseosos del metabolismo microbiano. Cada sensor se acondicionó a una aguja de metal calibrada insertada a la tapadera de los frascos de fermentación conteniendo la muestra a evaluar y el medio de cultivo inoculado con líquido ruminal. La señal de salida de cada uno de los sensores se transfirió a una micro computadora a través de un convertidor análogo digital.

Existen otras innovaciones tecnológicas en la medición de producción de gas. Cone *et al.* (1996) utilizaron transductores de presión en combinación con válvulas electrónicas para liberar la sobrepresión provocada por el gas

producido durante la incubación. Con las nuevas implementaciones técnicas, los autores estudiaron el efecto de la concentración del sustrato y fuente del líquido ruminal sobre la cinética de fermentación de pastura de centeno y mezclas de grano y ensilaje de maíz. Posteriormente, Cone y vanGelder (1999) evaluaron la influencia de la fermentación de proteínas sobre los perfiles de producción de gas. En estos estudios, cada frasco de fermentación se cerró con una tapadera de rosca en la que se montó el transductor de presión, conectado a su vez a la válvula. Cada vez que la presión de gas alcanzaba un valor previamente determinado, la válvula se abría automáticamente liberando el gas producido hasta que la presión de gas se igualase a la presión atmosférica, cerrándose posteriormente. El registro del número de veces que se abrió la válvula, permitió un monitoreo frecuente de la producción de gas.

Se han diseñado sistemas semi automatizados de evaluación de alimentos para rumiantes basados en la medición de producción de gas *in vitro*. Entre estos, el descrito por Mauricio *et al.* (1999), al que denominaron Técnica de Lectura de Presión (RPT). Este sistema, similar al reportado por Theodorou *et al.* (1994), constó básicamente de un transductor de presión conectado a un monitor digital y a una aguja de metal. Para cada una de las lecturas, la aguja se introdujo en frascos de fermentación conteniendo muestras de bagazo de caña de azúcar irradiados y pastura seca, entre otros sustratos. La diferencia metodológica respecto a lo especificado por Theodorou *et al.* (1994), es la eliminación de la jeringa utilizada para la medición del volumen de gas.

Además, el transductor fue conectado a una computadora para capturar directamente los valores de la presión del gas producido en la fermentación. Con estos valores se estimaron los volúmenes de gas, mediante una función cuadrática derivada simultáneamente a la captura de los datos de presión de gas.

Al igual que Pell y Schofield (1993) y Cone *et al.* (1996) otros autores, como Iwaasa *et al.* (1999) propusieron un sistema automatizado de medición de producción de gas conformado también por botellas de suero conectadas cada una con un sensor de presión y un solenoide a una computadora. Este sistema permitió el estudio continuo de la fermentación de sustratos de alfalfa y raciones totales mezcladas a base de maíz. Con este trabajo, los autores confirmaron que la técnica de producción de gas les permitió obtener una mejor descripción de la fase inicial de fermentación. También Davies *et al.* (2000), reportaron un método computarizado similar al propuesto por Cone *et al.* (1996). Al equipo empleado lo intitularon como Sistema de Evaluación de Presión Automatizada, (APES) el cual consistió en una serie de frascos conectados individualmente a interruptores y solenoides sensibles a la presión. Las válvulas también tuvieron la función de liberar automáticamente el gas producido cuando éste alcanzaba un valor de presión predeterminado. En este estudio, los autores reportan ejemplos del uso frecuente del APES para evaluar forrajes como alimento de rumiantes.

En los anteriores estudios de la producción de gas *in vitro* (realizados en su mayoría a forrajes), los autores han resaltado que debido a los implementos tecnológicos adicionados a la metodología, la técnica de producción de gas es un método rápido, simple, con un alto grado de reproducibilidad del ensayo y una ventaja muy importante es que permite tomar lecturas en cada intervalo de tiempo sobre la misma muestra sin necesidad de manipularla ni destruirla, además, proporciona una mejor descripción de la fase inicial de fermentación; todo lo cual no sucede con las técnicas tradicionales *in situ* e *in vitro* (Pell y Schofield, 1993; Iwaasa *et al.*, 1999; Pell *et al.*, 1999).

Varios de los sistemas propuestos (Pell y Schofield 1993; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1996) para medir la producción de gas, han sido usados para estudiar las características de fermentación de diferentes alimentos, en los que se incluyen: pastos (Schofield y Pell, 1995; Rymer *et al.*, 1997; González *et al.*, 1998; Groot *et al.*, 1998; Iantcheva *et al.*, 1999; Nagadi *et al.*, 2000^b; Nogueira *et al.*, 2000), alfalfa (El-Meadaway *et al.*, 1998), celulosa, glucosa y henos (Nagadi *et al.*, 2000^a), forrajes (Mir *et al.*, 1995; 1997; Doane *et al.*, 1997; 1998), fibras (Blümmel y Orskov, 1993; Schofield *et al.*, 1994; Blümmel y Becker, 1997; Blümmel *et al.*, 1997), bagazo de caña de azúcar (Vitti *et al.*, 1999), ensilajes (Beuvink y Kogut, 1993; Valentín *et al.*, 1999), fracciones del grano de maíz insolubles en detergente neutro y solubles en etanol (Chen *et al.*, 1999) entre otros. Son mucho más los estudios hechos en materiales fibrosos que en alimentos concentrados. Solamente se han evaluado muestras

específicas de granos de leguminosas (Fernandes y Martins, 1998), grano de cebada (El-Meadaway *et al.*, 1998), grano de trigo sin procesar (Adesogan *et al.*, 1998), proteína (Cone y van Gelder, 1999), degradación de proteína de grano de sorgo reconstituido y hojueado a vapor (Xion *et al.*, 1990), lo que conduce a seguir evaluando esta técnica de producción de gas en este tipo de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió en 3 etapas:

1. El establecimiento de la técnica de producción de gas.
2. La realización de pruebas de digestión *in vitro* tradicional (Tilley y Terry), *in situ* y producción de gas para estimar la velocidad de digestión de granos de trigo con diferente procesamiento.
3. La construcción de curvas de cinética de digestión de las muestras a partir de los resultados obtenidos en cada una de las técnicas.

Animales

Se utilizaron 3 novillos de la raza Holstein con cánula ruminal permanente y peso promedio de 350 kg, los cuales fueron alimentados con 8 kg diarios de una dieta integral (55:45 concentrado: forraje) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron alojados dentro de corraletas individuales de 3 m de largo por 2 m de ancho.

Material a Evaluar

El alimento a evaluar fue grano de trigo crudo (sin procesar), grano de trigo acondicionado 1 y acondicionado 2 (sometidos a diferentes surfactantes para aumentar su captación de humedad) y grano de trigo roado a vapor (sujeto a procesos de acondicionado, cocimiento a vapor y hojueleado). Todo

el material provenia del mismo lote de grano original sin procesar. Cada muestra por duplicado fue molida en un molino (Thomas-Wiley, Laboratory Mill model 4, Thomas Scientific USA) con criba de 2.0 mm y se mantuvieron en refrigeración durante su almacenamiento.

Técnicas de Digestión

Digestión *in Vitro*

Para las determinaciones de digestibilidad *in vitro* se utilizó la primera fase de la técnica modificada de Tilley y Terry (Llamas y Tejada, 1990).

Reactivos.

-Líquido ruminal

-Solución amortiguadora de McDougall

Solución 1.

Na_2HPO_4 anhidro	3.7 g
NaHCO_3	9.8 g
Agua deionizada, c.b.p.	1000 ml

Solución 2.

NaCl	4.7 g
KCl	5.7 g
CaCl_2	0.4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 ml

-Urea

1 g / l solución amortiguadora.

Preparación de la solución amortiguadora de McDougall. Se adicionaron 10 ml de la solución 2 a un litro de la solución 1; se agitó la mezcla con un agitador magnético (Corning Stirrer/hotplate, USA) por dos horas, durante las cuales se burbujeó lentamente CO₂ para permitir las condiciones de anaerobiosis; el pH fue de 6.9. La solución se colocó en baño maría a 39 °C.

Obtención del líquido ruminal. El líquido ruminal se obtuvo de uno de los novillos antes de que éste fuese alimentado por la mañana. Para ello, después de destapar la cánula del animal, se le extrajo digesta embebida en líquido ruminal que se filtró a través de cuatro capas de gasa dentro de un recipiente térmico. El líquido ruminal obtenido se trasladó rápidamente al laboratorio, donde se volvió a filtrar a través de 8 capas de gasa para separar los restos del alimento sin digerir e inmediatamente preparar el inóculo. Durante este rápido proceso, el líquido ruminal se mantuvo a temperatura estable (39 °C).

Preparación del inóculo. Después de haber disuelto la urea en la solución amortiguadora de McDougall, ésta se mezcló con el líquido ruminal en una proporción de 2:1. Se adicionaron 30 ml de esta solución a cada uno de los tubos de polietileno (100 ml, 165 x 35 mm de diámetro) previamente preparados con 1.5 g de muestra para cada tiempo de incubación (3, 6, 12, 24 y 36 h) por duplicado. Estos se saturaron con CO₂ para mantener las condiciones de anaerobiosis, cubriéndolos inmediatamente con tapones de hule (número 6½) y se incubaron en un baño maría con termostato (120V, Shaking bath, Lab-Linc Instruments, Inc, Melrose Park, IL USA) a temperatura de 39 ± 1 °C y agitación

constante. Posteriormente se extrajeron los tubos correspondientes a cada tiempo de incubación. De cada tubo se separó el residuo no digerido de la fase acuosa a través de papel filtro (Whatman No. 541). Las fracciones no digeridas de las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 100°C (Lindberg /Blue) hasta alcanzar peso constante para la determinación del porcentaje de materia seca (% MS). Se incineraron en una mufla (Thermolyne subsidiary of Sybron, type 30400 Furnace, USA) a 500 °C para la determinación del porcentaje de materia orgánica (% MO).

Digestión *in Situ*

Paralelamente se corrió una determinación de digestibilidad *in situ* usando la técnica de bolsa de nylon descrita por Orskov (1982). Para ello fueron requeridos dos novillos de raza Holstein canulados ruminalmente. Se utilizaron bolsas de nylon (20 cm de largo x 10 cm de ancho; con porosidad de 53 ± 10 micrones, Ankom Technology, Fairport, NY USA) conteniendo 5 g de la correspondiente muestra y tiempos de incubación (0, 3, 6, 12, 24 y 36 h) por duplicado para cada animal. En la cavidad ruminal se introdujeron inicialmente las bolsas pertenecientes al periodo más corto de incubación (excepto 0 h), colocadas a dos diferentes alturas dentro del rumen, asegurándose que las bolsas permanecieran completamente sumergidas en líquido ruminal. Se siguió el mismo procedimiento para los subsecuentes tiempos de incubación. A las 36 horas de incubación se extrajeron todas las bolsas del rumen, se enjuagaron

con agua corriente hasta que el flujo fuera claro. Se secaron en una estufa con aire forzado a 50 °C (Blem model C-4850-Q USA) hasta alcanzar peso constante para la determinación del % MS. La fracción no digerida de las muestras se incineraron en una mufia (Thermolyne subsidiary of Sybron, type 30400 Furnace, USA) a 500 °C para la determinación del % MO. Se incluyó la corrección por material soluble al sustraer el valor del % MO de cada una de las muestras durante el tiempo 0 a los valores obtenidos en los periodos de incubación consecutivos (3,6,12,24 y 36 h).

Producción de Gas

Para las mediciones de producción de gas se ensambló un sistema de medición similar al propuesto por Theodorou *et al.* (1994) con algunas modificaciones a la técnica.

Reactivos. La preparación de la solución amortiguadora de McDougall, la obtención del líquido ruminal y la preparación del inóculo se realizaron de acuerdo al procedimiento *in vitro* previamente descrito.

Se añadió 10 ml del inóculo a cada uno de los frascos (160 ml, Wheaton Scientific, Millville NJ USA) previamente preparados con 0.5 g de la respectiva muestra por duplicado. Éstos se saturaron con CO₂ para mantener las condiciones de anaerobiosis. Inmediatamente se taparon y sellaron herméticamente con septas de hule y anillos de aluminio (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA) mediante una selladora manual (8-20mm Hand operated crimpers, Wheaton Science Products, USA) e inmediatamente se incubaron en

baño maría con termostato (120V, Lab-Line Shaking bath, Lab-Line Instruments, Inc, Melrose Park, IL, USA) a 39 ± 1 °C hasta la finalización del período de fermentación (36-48 h de fermentación).

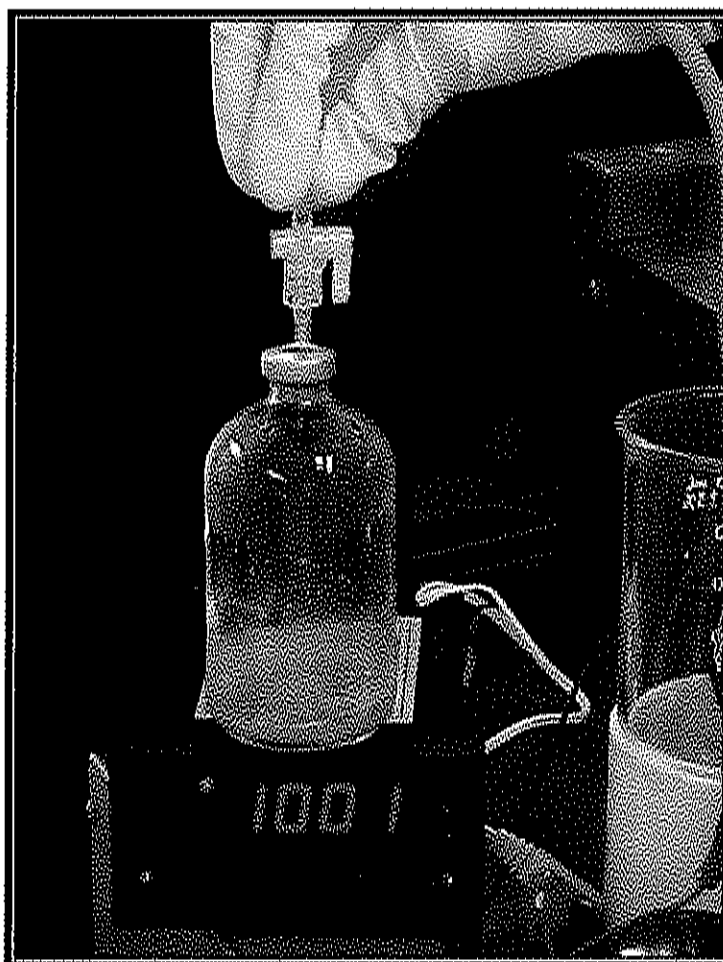
Mediciones de producción de gas. Un sensor de baja presión (164PC01D37 Low Pressure Sensors, 0-5 psi de rango con precisión de $0.1 \pm 0.2\%$ a 25 °C Micro Switch A Honeywell Division, USA) y un monitor digital (Display DIS871, input 0/10 mAdc, output 4/20 mAdc, Wilkerson Instrument Co., Inc Digital indicating system, USA) se utilizaron para medir la presión del gas producido en los frascos de fermentación. El monitor digital tuvo que ser calibrado para la función específica a medir, obteniendo una escala numérica donde el límite superior (1983) correspondió a la presión atmosférica y el límite inferior (-1896) al máximo valor de presión de gas detectado por el sensor; un voltímetro digital proporcionó la señal de salida del monitor equivalente a 290 y 19.5 mV para límite superior e inferior respectivamente). El sensor de presión se conectó por medio de una manguera de hule a uno de los tres extremos de una válvula (Three way stopcock Bio-Rad, Laboratories, CA USA) mediante un adaptador (Male Luer, 3.2 tubing Bio-Rad, Laboratories, CA USA). En el segundo extremo de la válvula se conectó una aguja de jeringa hipodérmica (23G X 25mm Plastipak, Becton Dickinson de México SA.de CV). El último extremo se utilizó para eliminar el gas producido. La señal de presión provocada por la producción de gas convertida en señal eléctrica se leyó en el monitor digital registrándose manualmente.

La toma de lecturas de presión de gas se inició inmediatamente después de inocular y sellar el frasco de fermentación equilibrando la presión interna del frasco con la presión atmosférica. Para cada una de las mediciones (Figura 1) se insertó la aguja a través de la tapadera del frasco de fermentación. La señal de presión de gas se registró cada vez que la presión provocada por el gas alcanzaba un diferencial de presión respecto a la atmosférica con valor equivalente a 7.0 mV, liberándose el gas producido hasta que la presión del frasco se ajustara nuevamente con la presión ambiental. Seguido al registro de cada lectura de presión de gas, el ensamble del transductor se extraía de la botella que se retornaba al incubador hasta la siguiente lectura. Se calculó que el tiempo requerido para la determinación de presión de gas fue entre 10-20 s por botella. Las mediciones de la producción de gas se realizaron cada 5-10 minutos durante las primeras 9 horas, cada 30 minutos hasta las 12 h y posteriormente cada 1-4 horas hasta completar las 36 horas de incubación o cuando ya no se registraron diferenciales de 7.0 mV de corriente eléctrica.

Construcción de Curvas de Cinética de Digestión

Con los datos obtenidos se construyeron curvas de cinética de digestión de cada muestra en cada una de las técnicas. En las digestiones tradicionales *in vitro* e *in situ*, se graficaron los porcentajes de desaparición de materia

Figura 1. Medición de producción de gas. El sensor de presión es conectado al monitor digital para medir la presión de gas dentro del frasco de fermentación. La aguja es insertada a través del tapón del frasco sellado. La lectura leída en el monitor digital es registrada manualmente. Posteriormente, el gas es eliminado cada vez que la producción de gas alcanza el diferencial de presión equivalente a 7.0 mV hasta igualarse con la presión atmosférica. Al cerrar la válvula se desprende el ensamble del sensor y la botella se retorna al incubador hasta la siguiente lectura.



orgánica de cada tratamiento contra el tiempo de incubación. En la técnica de producción de gas las curvas de cinética de digestión para cada frasco de fermentación se obtuvieron al graficar el número de cambios de presión de gas registrados con diferenciales equivalentes a 7.0 mV contra el tiempo de fermentación en que ocurrió cada cambio.

Valores Estimados de Velocidad de Digestión

La curva de cinética de digestión de cada muestra en cada técnica de digestión se ajustó a modelos de regresión: lineal (0-12 h de fermentación) $y=a+kt$ y logarítmica (0-36 h fermentación) $y=ae^{kt}$ donde "y" es la fracción digerida al tiempo "t", "a" es la desaparición inicial al tiempo = 0, "e" es la base de logaritmo natural y "k" es la tasa de velocidad de digestión.

Análisis de los Datos

Se utilizó el paquete estadístico Number Cruncher Statistical Systems (NCSST 6.0, 21, 1996). Los datos de desaparición de MO obtenidos *in vitro* e *in situ*, los cambios de presión por la producción de gas así como las velocidades de digestión se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de diferencia de cuadrados mínimos de Fisher con el procesamiento como factor principal. Las estimaciones de velocidad de digestión por la producción de gas se correlacionaron con los valores de MO obtenidos *in vitro* e *in situ*, datos que fueron sometidos a análisis de varianza y comparación de medias de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Técnica de Producción de Gas

En este trabajo, a semejanza del reportado por Theodorou *et al.* (1994) y Mauricio *et al.* (1999), solamente se utilizó un transductor de presión para las mediciones de gas producido en todos los frascos de fermentación. Cone *et al.* (1996) y Pell y Schofield (1993) manejaron un transductor de presión para cada una de las botellas empleadas; de igual forma, Davies *et al.* (2000) usaron interruptores individuales sensibles a la presión de gas. La falta de sensores para cada frasco en incubación limita el registro de resultados, aunque es mucho más económico.

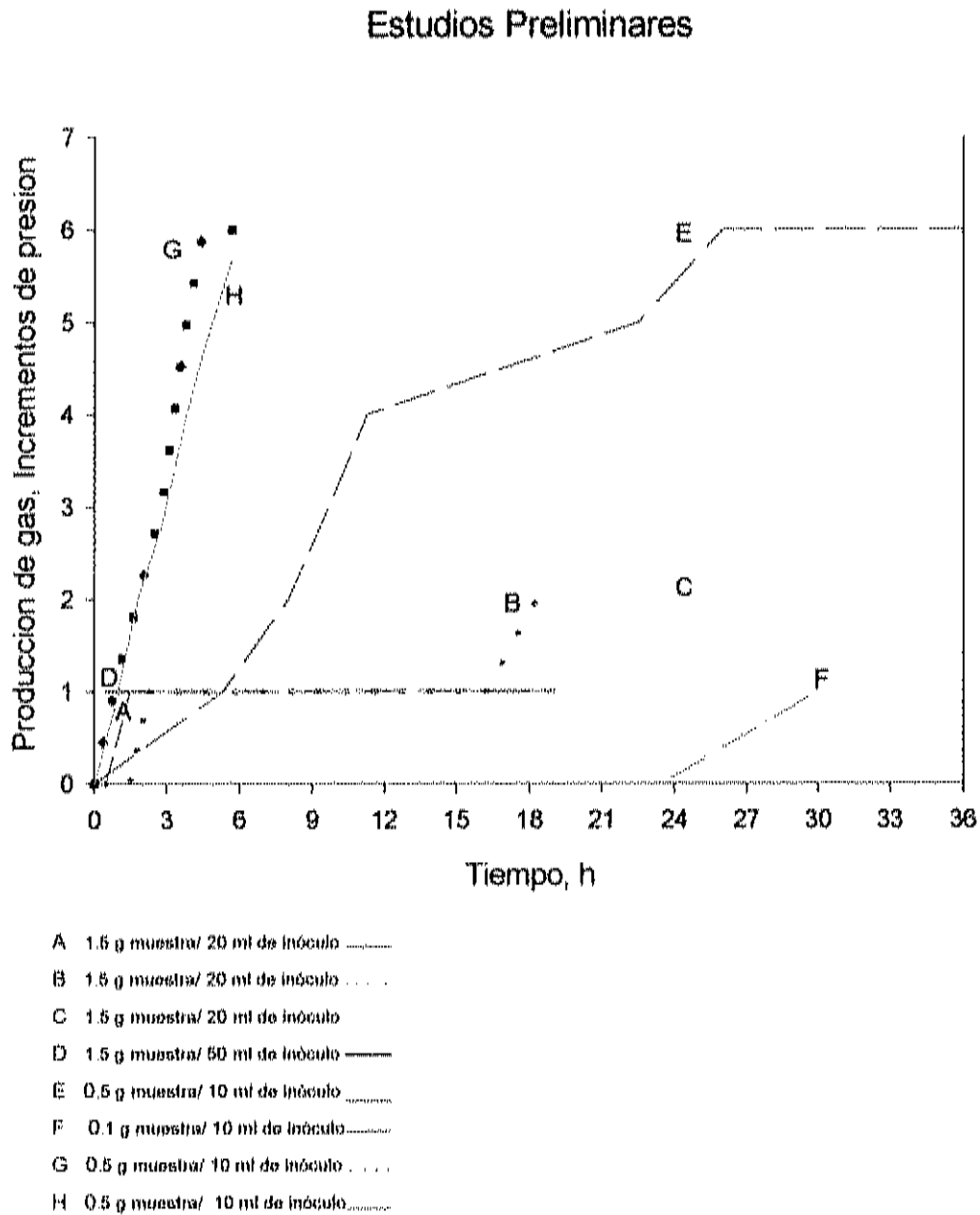
En una fase preliminar de estandarización, se realizó un monitoreo continuo de la presión de gas en fermentaciones de una muestra aleatoria. Se siguió el procedimiento descrito en la metodología con volúmenes de 10, 20 ó 50 ml de inóculo en botellas de 160 ml de capacidad conteniendo 0.1, 0.5 ó 1.5 g de muestra. Con las primeras incubaciones (1.5 g de sustrato con 20 y 50 ml de inóculo) se observó que a pesar de que el monitor digital proporcionaba solamente valores inestables e intermitentes los cuales variaban dentro de la escala numérica empleada, se podía identificar fácilmente un diferencial de presión de gas correspondiente a una caída de 7.0 mV con respecto a la presión atmosférica. Después de permanecer pocos minutos dentro de este rango definido, la lectura del monitor cambiaba abruptamente a su valor límite.

Aunque estas incubaciones presentaron visualmente una fermentación activa mucho más evidente que la que originó ese diferencial de presión de gas, la señal del sensor leída en el monitor digital permanecía fija (Figura 2 A, B, C, D), indicando que la producción de gas había saturado la capacidad del transductor utilizado.

Theodorou *et al.* (1994) encontraron en sus estudios que es conveniente liberar el gas producido en los frascos de cultivo y con mayor frecuencia durante la fase de rápida producción de gas para evitar una acumulación de componentes gaseosos en la parte superior del frasco que pueda reducir la tasa de fermentación del sustrato. Contrariamente a lo sugerido por Theodorou *et al.* (1994), Pell y Schofield (1993) reportaron que en sus estudios las botellas no fueron ventiladas durante la fermentación. En el presente trabajo resultó necesario liberar el gas producido porque presiones que sobrepasaran el diferencial equivalente a 7.0 mV saturaban fácilmente la capacidad del sensor impidiendo ser detectadas por el equipo.

En el frasco de fermentación conteniendo 0.1g de muestra en 10 ml de inóculo (Figura 2 F) no existió actividad microbiana suficiente para ser detectada por el sensor. La combinación de 0.5 g de muestra y 10 ml de solución inoculada (Figura 2 E, G, H) resultó en mejores y más frecuentes detecciones de presión en el transductor, facilitando la construcción de las curvas de cinética de digestión. Theodorou *et al.* (1994) demostraron una respuesta lineal de la producción de gas con relación al peso del sustrato que varío entre el rango de

Figura 2. Pruebas preliminares de medición de producción de gas en fermentaciones con la misma muestra aleatoria a diferentes tiempos de incubación.



0.2-2.0 g de muestra en frascos de 125 ml de capacidad. En el sistema de evaluación de presión automatizado (APES) de Davies *et al.* (2000) se utilizaron 100 ml de líquido ruminal buferizado en frascos de 140 ml de capacidad conteniendo 1.0 g de sustrato, mientras que Gane *et al.* (1996) incubaron 0.4 g de MO del sustrato en 60 ml de medio de cultivo en botellas de 250 ml. Las diferencias metodológicas existentes en estos trabajos de investigación, hacen difíciles las posibles comparaciones entre los perfiles de producción de gas encontrados. Es necesaria mayor información acerca del efecto del peso de muestra y volumen del inóculo sobre la producción de gas en diferentes alimentos.

Aunque los valores entre la relación sustrato/inóculo citados, resultan muy divergentes a los empleados en este estudio, es importante notar que estos investigadores evaluaron sustratos tales como pastos, ensilajes y forrajes. Los materiales fibrosos presentan diferencias en velocidad y extensión de digestión mucho más lentas que los granos, así como diferencias notables en las cinéticas de digestión. De acuerdo a Beuving y Kogut (1993), los forrajes presentan curvas de producción de gas o desaparición de materia seca con tendencia sigmoidea de tres fases: la fase lenta de producción de gas que involucra la hidratación, ataque microbiano y colonización, la segunda fase es la exponencial que representa la degradación enzimática y la tercera es cuando la velocidad de producción de gas disminuye llegando hasta cero (fase asintótica). En los granos es tan rápida la velocidad de digestión inicial que en las curvas

de cinética de digestión obtenidas no se observa la fase lenta. Además los granos no necesitan tener tiempos de fermentación tan largos como los requeridos para forrajes (hasta 76 h promedio).

Las curvas de cinética de digestión por la técnica de Producción de Gas se construyeron al graficar el número de veces que la presión de gas alcanzó diferenciales equivalentes a 7.0 mV contra el tiempo de fermentación en que ocurrió cada uno de ellos. Esto fue similar a lo que Davies *et al.* (2000) registró con el APES mediante interruptores que se activaban cuando el gas alcanzaba presiones de 4.5 kPa y ser liberado automáticamente. También registraron el volumen de gas necesario para causar la liberación del gas, equivalente a 2 ml; este valor se multiplicó por la frecuencia y el tiempo en que el gas era liberado. En el sistema automatizado propuesto por Cone *et al.* (1996) el gas era liberado automáticamente cada vez que alcanzaba una presión de 0.65 kPa equivalente a casi 0.7 ml de gas. En el presente estudio no se estudió el volumen de gas producido y la presión se midió como señal eléctrica la cual resultó ser una factible alternativa para evaluar de manera rápida y sencilla la producción de gas. Sin embargo, la medición del equivalente de gas en unidades de volumen proporciona parámetros de comparación directa con los obtenidos por las técnicas *in vitro* e *in situ* tradicionales.

Técnicas de Digestión *in Vitro*, *in Situ* y Producción de Gas

En las Tablas 1 y 2 se reportan los valores promedio de desaparición de materia orgánica de las muestras en los tiempos fijos de incubación (3, 6, 12, 24 y 36 h) por los métodos *in vitro* e *in situ* respectivamente. En la Tabla 3 se indica para cada una de las muestras, el tiempo promedio de fermentación en el que ocurrió cada uno de los incrementos de producción de gas que alcanzaron el diferencial de presión equivalente a 7.0 mV con respecto a la presión atmosférica.

En la técnica *in vitro*, las menores digestiones se presentaron con el trigo rolado a partir de las 6 horas de incubación; siendo la desaparición del 44.23% de MO diferente ($p = 0.02$) al trigo crudo y trigos acondicionados, los cuales obtuvieron (al concluir la fermentación) desapariciones promedio del 55.89% y 57.91% de MO respectivamente. En cambio, en la evaluación *in situ*, aunque el trigo rolado a tiempos iniciales tampoco mostró altos porcentajes de desaparición, al final alcanzó una digestión máxima del 61.55% de MO resultando mayor y diferente ($p = 0.00007$) al trigo crudo con una desaparición del 55.42% y a los trigos acondicionados que presentaron las menores digestiones al obtener una desaparición promedio solamente del 33.3% de MO. Para obtener *in situ* los valores de desaparición de MO insoluble reportados, los datos obtenidos experimentalmente en cada uno de los tiempos de incubación (3, 6, 12, 24 y 36 h) se corrigieron restándoles el correspondiente tiempo "0 h" de incubación. Antes de efectuar la corrección por material soluble, el grano de

trigo rolado presentó la menor digestión y los trigos acondicionados las mayores, similar a los resultados obtenidos *in vitro*. El contraste de los resultados encontrados *in situ* antes y después de la corrección por material soluble, sugiere que la fracción soluble puede ser mayor en los trigos acondicionados produciendo valores bajos que *in vitro* no aparecieron.

En la digestión realizada *in vitro* los valores de la desaparición de materia orgánica obtenidos a las tres horas de incubación fueron negativos en todas las muestras (trigo crudo: -0.2% MO; trigo acondicionado 2: -9.98% MO; trigo rolado: -6.18% MO) a excepción del trigo acondicionado 1 (7.52% MO). Los valores negativos pudieron deberse a que el peso del material que desaparece se obtiene mediante el filtrado de la muestra no digerida, resultando en desapariciones iniciales muy pequeñas que son proporcionalmente afectadas por los errores experimentales de diversos orígenes: residuos de partículas ruminales, microorganismos adheridos a la muestra, errores en el peso del filtro, diferencias entre muestras, etc., originando pesos mayores al inicial. La técnica *in situ* también es afectada por varios de los factores mencionados, pero la exposición continua del material soluble ó digerido al medio ruminal hace que sea menos evidente este error.

En la técnica de producción de gas no existe influencia de estos factores sobre los resultados. Además, se pudieron registrar diferenciales de presión casi desde la primera hora de incubación con todas las muestras analizadas (trigo crudo: 1.0 h; trigos acondicionados: 1.13 h; trigo rolado: 1.50 h). El grano

de trigo rolado tuvo la producción de gas más baja debido a que presentó el menor número de incrementos de gas que alcanzaron el diferencial de presión equivalente a 7.0 mV (trigo crudo con 10, trigo acondicionado 1 con 10, trigo acondicionado 2 con 8 y trigo rolado con 7 diferenciales de presión). La producción de gas más lenta también fue presentada por el grano de trigo rolado, cuyos incrementos ocurrieron en períodos de tiempo mayores al resto de las muestras (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* donde el grano de trigo rolado presentó las menores digestiones.

Durante la fermentación anaeróbica de las muestras existió diferencia entre los tiempos en que se registraron el primer ($p = 0.000017$), el segundo ($p = 0.034884$) y séptimo ($p = 0.33262$) incremento de producción de gas (Tabla 3). En todas las muestras de trigo evaluadas, la mayoría de los incrementos de producción de gas ocurrieron antes de las 12 horas, lo que indica una clara reducción de la fermentación microbiana después de ese tiempo. Considerando que los incrementos de gas se registraron cada vez que éstos alcanzaron el diferencial de presión equivalente a 7.0 mV, se explica que el hecho de no registrarse más diferenciales de presión después de las 23 horas de fermentación no significa la ausencia de producción de gas, solamente sugiere que éste no aumentó lo suficiente para poder ser detectado por el equipo utilizado en este estudio.

Tabla 1. Valores Promedio¹ de Desaparición de Materia Orgánica (%) *in Vitro*.

Tiempo de Incubación (h)	Trigo Crudo	Trigo Acondicionado 1	Trigo Acondicionado 2	Trigo Rolado	ES ²
3	- 0.20	7.52	- 9.98	- 6.18	4.17
6	11.25	19.10	22.78	9.54	2.55
12	31.61	40.59	30.88	22.04	3.80
24	48.51	49.60	44.59	35.14	5.28
36	55.89 ^a	60.03 ^a	55.78 ^a	44.23 ^b	2.03

a,b Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

1 Promedio de 2 repeticiones por duplicado.

2 Error estándar.

Tabla 2. Valores Promedio¹ de Desaparición de Materia Orgánica (%) *in Situ*.

Tiempo de Incubación (h)	Trigo Crudo	Trigo Acondicionado 1	Trigo Acondicionado 2	Trigo Rolado	ES ²
3	23.01 ^a	0.26 ^c	6.18 ^{bc}	9.46 ^b	1.39
6	41.58 ^a	20.48 ^b	22.92 ^b	20.82 ^b	1.42
12	50.51 ^a	27.29 ^c	30.96 ^{bc}	37.56 ^b	1.52
24	54.14 ^a	31.52 ^b	33.38 ^b	55.39 ^a	0.47
36	55.42 ^b	32.22 ^c	34.37 ^c	61.55 ^a	0.51

a,b,c Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

1 Promedio de 2 repeticiones por duplicado.

2 Error estándar.

Tabla 3. Tiempo promedio¹ (h) de Fermentación al Momento de Registrarse los Incrementos de Producción de Gas que Alcanzaron Diferenciales Equivalentes a 7.0 mV con Respecto a la Presión Atmosférica.

Producción de Gas (Número de incrementos)	Trigo Crudo	Trigo Acondicionado 1	Trigo Acondicionado 2	Trigo Rolado	ES ²
1	1.00 ^c	1.07 ^{bc}	1.18 ^b	1.50 ^a	0.04
2	1.93 ^b	1.86 ^b	2.48 ^{ab}	2.77 ^a	0.23
3	2.94	3.01	3.40	3.49	0.15
4	3.64	3.80	4.02	4.23	0.19
5	4.16	4.43	4.79	9.40	2.25
6	5.21	5.89	5.80	10.94	2.07
7	6.73 ^b	14.06 ^{ab}	15.90 ^{ab}	22.90 ^a	3.29
8	12.08	18.33	22.90	-	-
9	19.48	18.67	-	-	-
10	22.90	22.90	-	-	-

a,b,c Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

1 Promedio de 2 repeticiones por duplicado.

2 Error estándar.

La relación de 0.5 g de sustrato incubado en 10 ml de inóculo utilizada en la técnica de medición de producción de gas, resultó proporcional al 1.5 g de muestra incubada en 30 ml de inóculo usado *in vitro*. Sin embargo, en las técnicas *in vitro* tradicional e *in situ* solamente un número limitado de muestras pudo ser evaluado en cada intervalo de tiempo de incubación; además, los análisis del alimento destruyeron la muestra, requiriéndose una muestra para cada intervalo de tiempo. Con la técnica de producción de gas, en un frasco conteniendo la muestra a evaluar, se tomaron todas las lecturas de presión sin necesidad de manipularla ni destruirla, eliminando a su vez la variación entre muestras.

En las metodologías *in vitro* e *in situ* como son pequeñas las pérdidas de peso correspondientes a las etapas iniciales de digestión, solamente se evaluaron 3 tiempos durante las primeras 12 horas de incubación, haciendo esta fase de la cinética de digestión, difícil de estudiar esta fase de la cinética de digestión. Con la técnica de producción de gas se obtuvieron la mayoría de las lecturas de presión antes de las 12 horas de incubación haciendo evidente la gran actividad fermentativa de los granos, que no fue medible con las técnicas tradicionales que originalmente se diseñaron para forrajes. Al utilizar la metodología de producción de gas para evaluar la digestión de materiales fibrosos, Davies *et al.* (2000) reportaron que solamente la mitad del total de gas se produjo dentro de las 10 primeras horas de fermentación. En el presente estudio casi la totalidad del gas fue producida durante las primeras 12 horas de

fermentación en todas las muestras de trigo evaluadas. Estos resultados confirman lo esperado, debido a que los forrajes presentan digestiones lentas y los granos una digestión mucho más rápida.

Curvas de Cinética de Digestión

Todas las curvas de cinética de digestión por desaparición de materia orgánica y producción de gas de cada muestra, se ajustaron a los modelos de regresión lineal 0-12 horas y logarítmico 0-36 horas. Las pendientes de los modelos lineales corresponden a la velocidad de digestión inicial mientras que las pendientes del modelo logarítmico indican la velocidad de digestión a 36 horas. En la Tabla 4 se presenta la media de las velocidades de digestión inicial para cada una de las muestras. En la técnica *in situ*, el trigo rolado alcanzó una desaparición del 3.07% MO/h presentando la mayor velocidad de digestión inicial, lo cual no sucedió en las técnicas *in vitro* tradicional y en la medición de producción de gas. En las técnicas de digestión evaluadas no se presentaron diferencias entre las velocidades iniciales de las muestras. Sin embargo, *in vitro* tradicional e *in situ* durante ese periodo de tiempo (12 horas) solamente se realizaron 3 lecturas (3, 6 y 12 horas) a diferencia de la técnica de producción de gas donde se obtuvieron el doble de observaciones (la mayoría de los incrementos de producción de gas que alcanzaron el diferencial de presión equivalente a 7.0 mV se registraron dentro de ese lapso de tiempo). Además, las lecturas obtenidas en la producción de gas fueron tomadas sobre la misma muestra por lo que los resultados tuvieron una menor variación.

Tabla 4. Velocidades de Digestión 0-12 h¹ de Grano de Trigo

Procesamiento	<i>In Vitro</i> (% h ⁻¹)	<i>In Situ</i> (% h ⁻¹)	Producción de Gas (incrementos de producción de gas h ⁻¹) ³
Crudo	3.51	2.83	0.99
Acondicionado1	3.66	2.74	1.14
Acondicionado2	4.08	2.55	0.91
Rolado	2.99	3.07	0.95
ES ²	0.523	0.269	0.048

1 Promedio de 2 repeticiones por duplicado.

2 Error estándar.

3 Incrementos de producción de gas que alcanzaron un diferencial de presión equivalente a 7.0 mV.

Tabla 5. Velocidades de Digestión 0-36 h¹ de Grano de Trigo

Procesamiento	<i>In Vitro</i> (ln% h ⁻¹)	<i>In Situ</i> (ln% h ⁻¹)	Producción de Gas (ln incrementos de producción de gas h ⁻¹) ³
Crudo	23.56	12.43 ^b	174.19
Acondicionado1	21.32	12.06 ^{bc}	149.98
Acondicionado2	24.19	10.75 ^c	145.67
Rolado	19.87	21.88 ^a	127.95
ES ²	1.732	0.363	11.835

a,b,c Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0.05).

1 Promedio de 2 repeticiones por duplicado.

2 Error estándar.

3 Incrementos de producción de gas que alcanzaron diferenciales de presión equivalentes a 7.0 mV.

La media de las velocidades de digestión hasta las 36 horas de fermentación para cada uno de los procesamientos se muestran en la Tabla 5. La digestión *in situ* nos indica diferencias entre las muestras que no se encontraron con las digestiones *in vitro* tradicional ni en la técnica de producción de gas donde el trigo rolado mostró la velocidad de digestión a 36 horas más lenta al obtener una desaparición del $\ln 19.87\%$ MO/h y $\ln 127$ incrementos de producción de gas/h, respectivamente. Éstos resultados contrastan nuevamente con los obtenidos *in situ*, donde presenta la más alta velocidad de digestión el trigo rolado que alcanzó una desaparición del $\ln 21.88\%$ MO/h diferente ($p = 0.0006$) al trigo crudo con $\ln 12.43\%$ MO/h y a los trigos acondicionados que presentaron las menores velocidades de digestión a 36 horas con $\ln 11.405\%$ MO/h.

Aunque en la técnica de producción de gas se midió una variable diferente al de las dos técnicas tradicionales, sus resultados estadísticos fueron similares con los de *in vitro*. El sesgo en los resultados provocado por el inóculo y o su fuente afectó a ambas. Aunque la técnica de digestión *in vitro* tradicional se ha establecido como un apropiado predictor de la desaparición de materia seca *in vivo* de forrajes, al igual que *in situ* no fueron las técnicas más adecuada para evaluar la velocidad de digestión inicial de los granos rápidamente fermentables tal como el trigo evaluado en el presente estudio. Con la producción de gas se logró una mejor descripción de la etapa inicial de fermentación al obtener un número mayor de lecturas dentro de las primeras 12

horas de digestión. De tal modo, las estimaciones de velocidad de digestión a tiempos cortos se pueden definir mejor por la producción de gas que por las técnicas *in vitro* tradicional e *in situ*.

Las curvas de cinética con los modelos que pronostican la digestión promedio hasta las 12 horas de fermentación de cada muestra en cada una de las técnicas de digestión se presentan en la Figura 3. En la Figura 4 se observan las curvas de cinética de digestión y los modelos que pronostican la digestión total promedio hasta 36 horas. En ambas figuras se ilustra como las técnicas *in situ* e *in vitro* no permiten obtener datos a tiempos muy cortos. En la producción de gas se empezaron a obtener datos en tiempos mucho menores de haberse iniciado las fermentaciones, proporcionando información acerca de la etapa inicial de digestión, difícilmente obtenible por las técnicas tradicionales. En las curvas de cinética de digestión obtenidas en la producción de gas (Figura 4) se observan fases iniciales muy rápidas así como una disminución marcada al comenzar la fase estacionaria (punto de inflexión). Aunque las curvas de cinética de digestión en las tres técnicas no muestran un evidente comportamiento estacionario y fase asintótica, los valores estimados son cercanos a los obtenidos experimentalmente, resultando el modelo logarítmico de digestión adecuado para describir la digestión hasta las 36 horas.

Figura 3. Modelos lineales de desaparición de materia orgánica *in vitro* (y_a), *in situ* (y_b) e incrementos de producción de gas (y_c) a 12 horas para trigo con diferentes procesamientos.

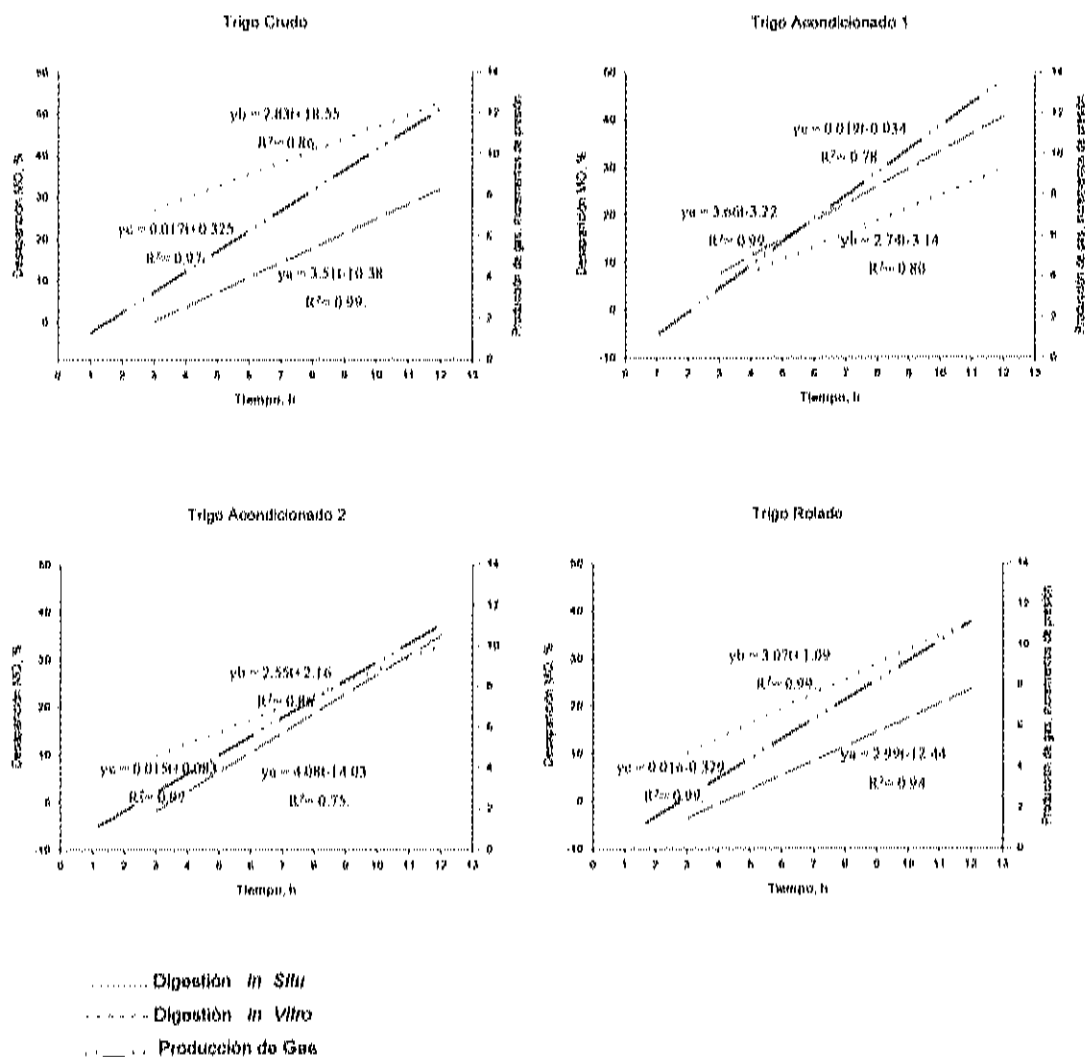
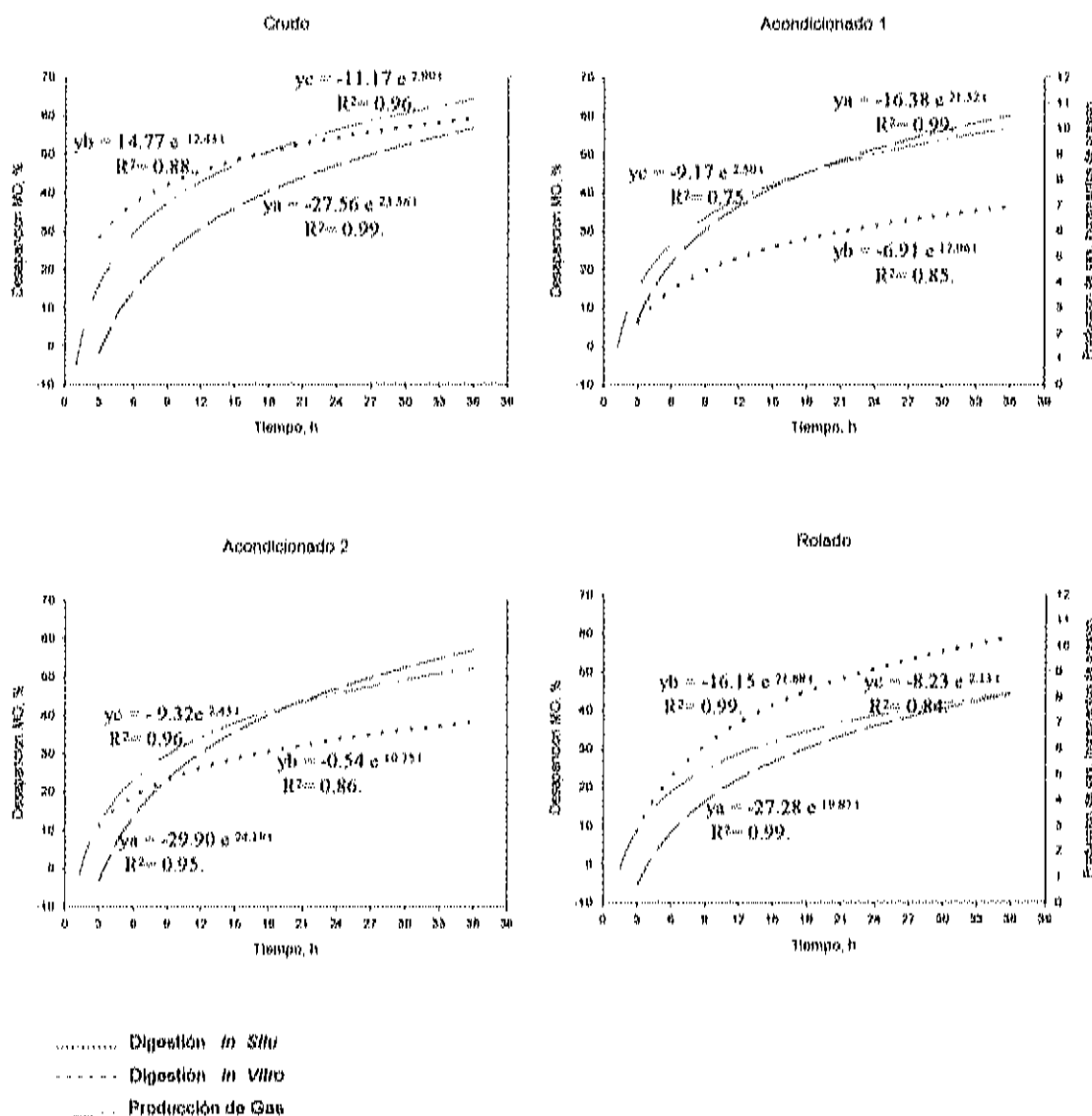


Figura 4. Modelos logarítmicos de desaparición de materia orgánica *in vitro* (y_a), *in situ* (y_b) e incrementos de producción de gas (y_c) a 36 horas para trigo con diferentes procesamientos.



Valores Estimados de Digestión

Como en las técnicas *in vitro* tradicional e *in situ* se midió la desaparición de materia orgánica y la producción de gas en unidades de presión, estas escalas no pueden ser directamente comparadas entre sí. Se calculó el número de incrementos en producción de gas que habría al momento de la digestión máxima medida por las dos técnicas tradicionales. Estos valores estimados se graficaron para la digestión inicial a 12 horas y la completa a 36 horas (Figuras 5 y 6 respectivamente). Las pendientes obtenidas se compararon asumiéndose que la relación ideal de la producción de gas con la desaparición de materia orgánica sería una ecuación lineal con pendiente igual a 1.0. Las medias de las pendientes se reportan en la Tabla 6. Durante las 12 horas de incubación, la relación de producción de gas vs *in vitro* resultó mayor (0.43) y diferente ($p = 0.036$) respecto a la producción de gas vs *in situ* (0.33). En el caso de los modelos a 36 horas de digestión, se encontró la misma tendencia aunque con una menor significancia ($p=0.157$), probablemente debida a una mayor variación entre los resultados. No obstante, la comparación de producción de gas con *in vitro* es casi igual a 1 (0.98), indicando su mejor relación a diferencia con *in situ* (0.69). Esto es explicable debido a que existe una mayor similitud entre las metodologías, como son la fuente y colecta del líquido ruminal, la ausencia del recambio en el medio, etc. Sin embargo, gráficamente se aprecia que las diferencias entre ambas relaciones se van

Figura 5. Relación de las estimaciones de digestión hasta las 12 h de fermentación (lineal 0-12 h) obtenidas por la técnica de producción de gas con respecto a las técnicas de desaparición *in vitro* e *in situ*.

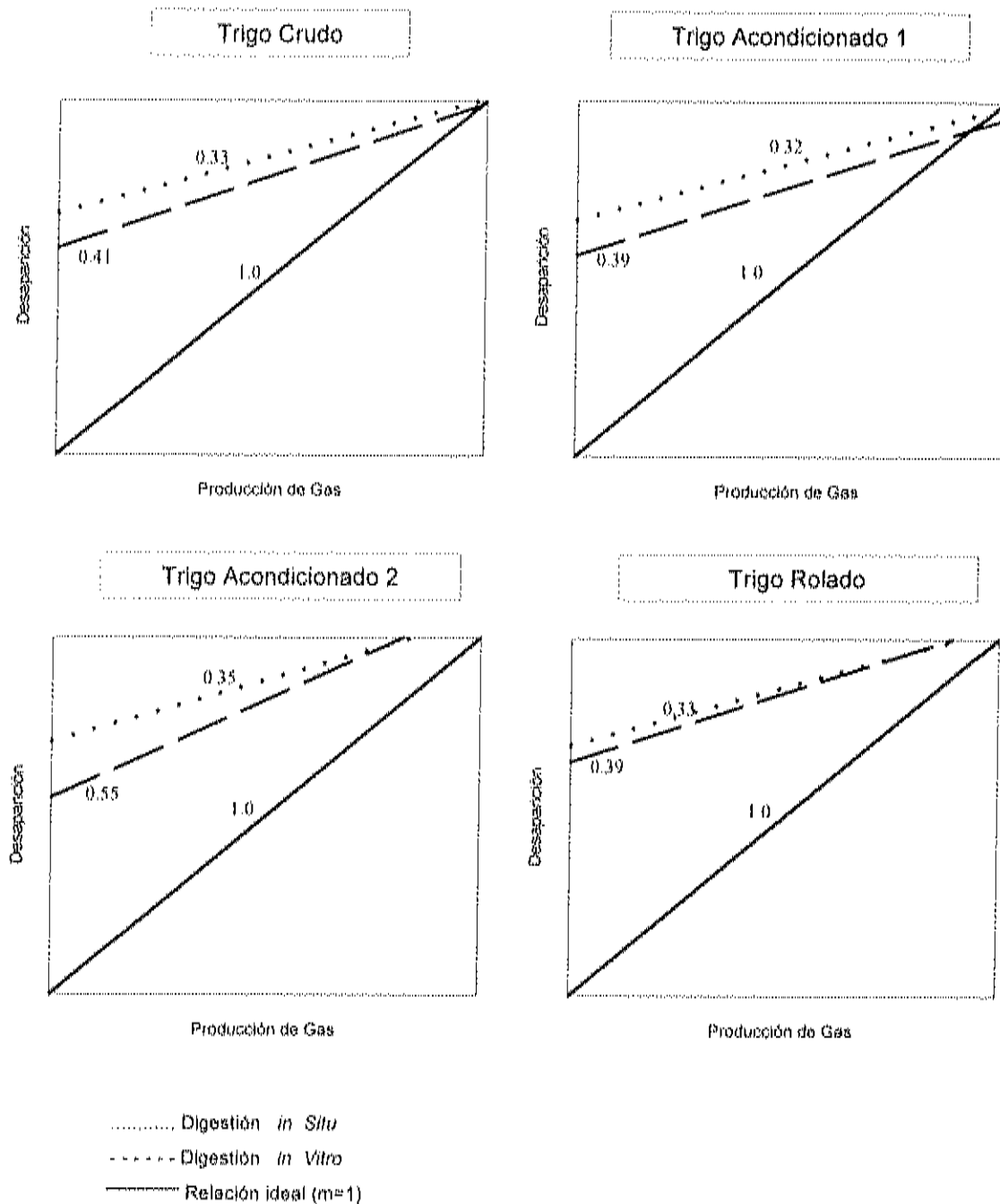


Figura 6. Relación de las estimaciones de digestión hasta las 36 h de fermentación (logarítmico 0-36 h) obtenidos por la técnica de producción de gas con respecto a las técnicas de desaparición *in vitro* e *in situ*.

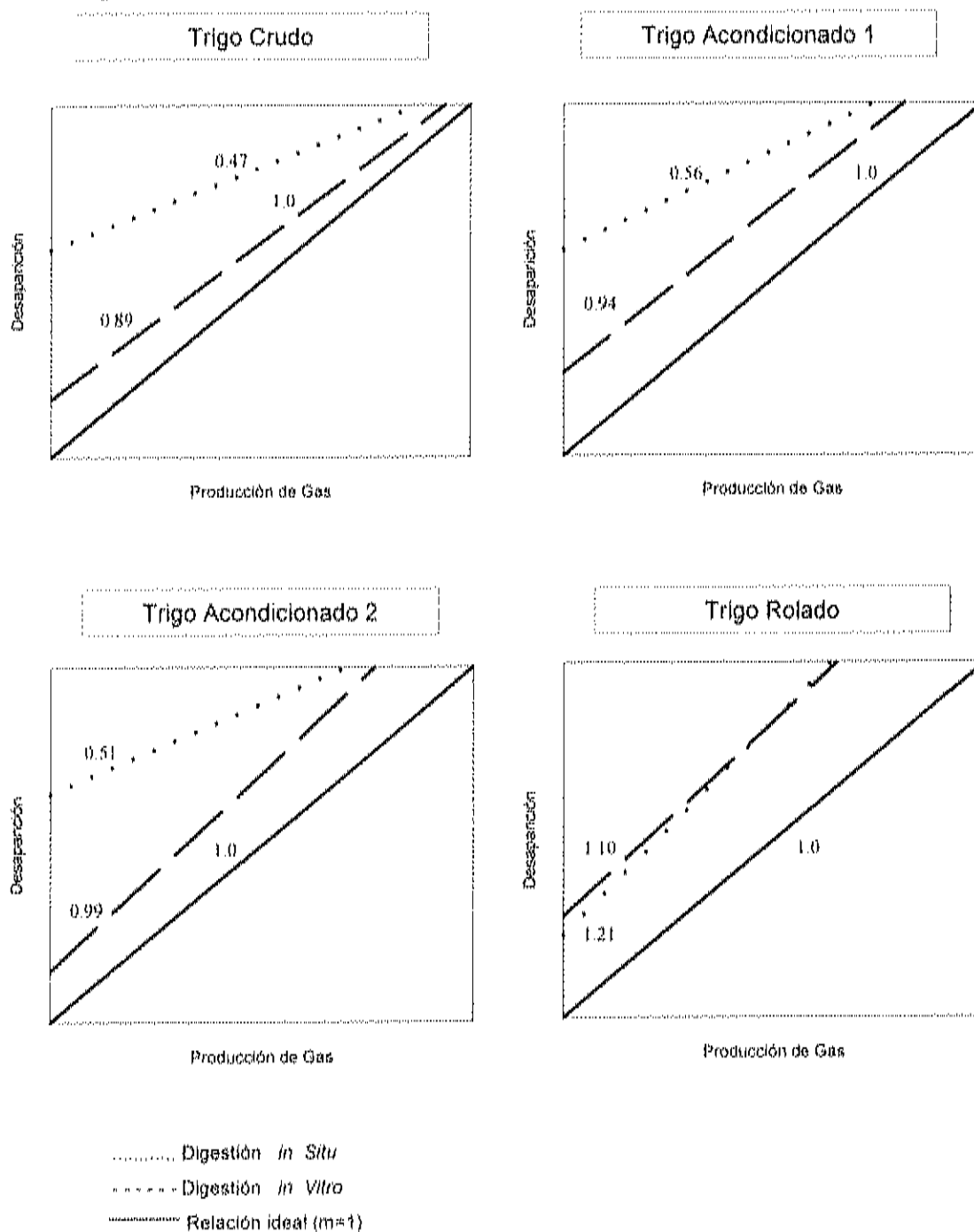


Tabla 6. Comparación Entre las Estimaciones de Desaparición de Material (*in Vitro* e *in Situ*) y la Producción de Gas¹.

Comparación	Modelo a 12 h	Modelo a 36 h
<i>In Situ</i> vs PG ²	0.33 ^b	0.69
<i>In Vitro</i> vs PG ²	0.43 ^a	0.98
ES ³	0.027	0.128
Valor de p	0.036	0.157

a,b Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

1 Los valores son pendientes de modelos lineales de comparación entre las dos técnicas.

2 Producción de gas.

3 Error estándar.

reduciendo conforme aumenta la digestión, lo cual refuerza que en digestiones iniciales presenta una mayor utilidad la medición de producción de gas.

Las diferencias entre los resultados de producción de gas e *in situ* obtenidas en este trabajo concuerdan con el estudio realizado por Valentin *et al.* (1999) donde se utilizaron estas técnicas para describir la degradación del ensilaje de maíz. La desaparición de materia seca y la producción de gas no dieron las mismas predicciones del valor nutritivo evaluado. Lo anterior puede ser explicado por la pérdida de la fracción no degradada, la cual ocurrió solo con la bolsa de nylon (*in situ*) y no con la técnica de producción de gas. Al intentar encontrar correlaciones entre los métodos, demostraron que fue difícil el predecir los parámetros de degradación (obtenidos *in situ*) a partir de los valores de producción de gas.

Otro estudio comparativo de la producción de gas e *in situ* como predictores de la digestibilidad aparente *in vivo* y la ingesta voluntaria de henos se realizó por Khazaal *et al.* (1993). Los autores reportan que al evaluar hasta las 96 h diferentes periodos de incubación, solo durante las primeras 3 y 6 h, la relación (*r*) de la digestión *in vivo* con la producción de gas fue ligeramente más alta que con la degradación *in situ*. No obstante, la relación con esta última técnica fue más estable y resultó ser un mejor predictor tanto de la ingesta como de la digestión total de materia seca de henos debido a que sus predicciones fueron ligeramente más precisas. Resultados que indican una

mejor descripción de la fase inicial de fermentación por la producción de gas que por *in situ*, similar a lo reportado en el presente trabajo.

La digestión *in situ* de forrajes durante tiempos prolongados es más difícil de interpretar que los efectos a periodos cortos, debido a la evolución del ambiente de incubación propio del medio ruminal. La población microbiana en la bolsa esta influenciada por la población nativa del rumen, con cambios a través del curso del día; mientras que en producción de gas es sobre el tiempo de una incubación, así la población microbiana puede ser más estable debido a que no hay un flujo de salida ni de entrada de microorganismos. Con el tiempo los microorganismos maduran y gastan nutrientes para su mantenimiento y no se reproducen, posteriormente mueren y se convierten en sustrato adicional, dando incremento a la producción de gas seguido de la finalización de la incubación (Valentin *et al.*, 1999). Otros factores que pueden influir son la producción indirecta del gas a partir de la solución amortiguadora, la dependencia de la producción de gas con los productos finales de fermentación y el potencial microbiano para incrementar la producción de AGV ó láctato (Adesogan *et al.*, 1998). Aunque en el presente trabajo se evaluaron granos de trigo, cuyas características de extensión y velocidad de digestión varían a los forrajes, los factores previamente descritos pueden explicar las divergencias en resultados encontradas entre las técnicas de producción de gas e *in vitro* con la técnica *in situ*.

En las investigaciones realizadas, incluyendo el presente estudio, más que buscar un método a sustituir por el otro, debe encontrarse el método de laboratorio más adecuado a los objetivos de investigación. Si el objetivo de un estudio es el describir como la cinética de digestión es afectada por los efectos de la dieta (nivel de ingesta, pasaje, disponibilidad de nutrimentos, etc.) y las interacciones del animal, debe ser considerado el procedimiento *in situ*. Si el interés en la investigación son las comparaciones de las diferencias intrínsecas de los alimentos, se puede tomar en cuenta el uso de un procedimiento *in vitro* (Varel *et al.*, 1995). En estudios donde se requieran descripciones más detalladas de la fase inicial de la cinética de digestión de los alimentos, como el caso de granos rápidamente fermentables, el método de producción de gas es apropiado considerando sus ventajas metodológicas y su precisión en la predicción de la digestión inicial en comparación con otras técnicas.

CONCLUSIONES

La producción de gas acumulada, medida por incrementos de presión predeterminados es una alternativa viable para la construcción de curvas de cinética de digestión.

Las estimaciones de la tasa de digestión inicial de granos rápidamente fermentables mediante un modelo lineal de producción de gas resulta más adecuado que las técnicas tradicionales.

El uso de transductores de presión sensibles a presiones más bajas es necesario para tiempos mayores a 12 horas y cambios más pequeños de presión entre las lecturas.

La predicción de digestión de cereales por la técnica de producción de gas se comporta de manera similar a la obtenida por la técnica *in vitro* tradicional a 36 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adesogan AT, Owen E, Givens DI. 1998. Prediction of the *in vivo* digestibility of whole crop wheat from *in vitro* digestibility, chemical composition, *in situ* rumen degradability, *in vitro* gas production and near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.*;74:259-272.
- Axe DE, Bolsen KK, Harmon KL, Lee RW, Milliken GA, Avery TB. 1987. Effect of wheat and high-moisture sorghum grain feed singly and in combination on ruminal fermentation, solid and liquid flow, site and extent of digestion and feeding performance of cattle. *J. Anim. Sci.*; 64:897-906.
- Bauer ML, Herold DW, Britton RA, Stock RA, Klopfenstein TJ, Yates DA. 1995. Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.*;73:3445:3454.
- Beauchemin KA, McAllister TA, Dong Y, Farr BI, Cheng KJ. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *J. Anim. Sci.*;72:236-246.
- Beuvink JMW and Kogut J. 1993. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *J. Anim. Sci.*;71:1041-1046.
- Beuvink JMW and Spoelstra SF. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*;37:505-509.
- Blümmel M and Becker K. 1997. 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. *British J. Nutr.*; 77(5):757-768.
- Blümmel M and Orskov ER. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*;40:109-119.
- Blümmel M, Steingäß H, Becker K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British J. Nutr.*;77(6):911-921.
- Burrin DG, Stock RA, Britton RA. 1987. Monensin level during grain adaptation and finishing performance in cattle. *J. Anim. Sci.*;66:513-521.
- Cheng KJ, McAllister TA, Popp JD, Hristov AN, Mir Z, Shin HT. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*;76:299-308.
- Chen YK, Pell AN, Chase LE, Schofield P. 1999. Rate and extent of digestion of the ethanol-soluble and neutral detergent-insoluble fractions of corn grain. *J. Anim. Sci.*;77:3077-3083.
- Cherney JR, Siciliano-Jones J, Pell AN. 1993. Technical note: forage *in vitro* dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. *J. Anim. Sci.*;71:1335-1338.
- Church DC, Pond WG. 1978. Chapter 3 The gastro-intestinal tract and nutrition, Chapter 4 Measurement of nutrient utilization and requirements of animals, Chapter 18 Feedstuffs for animals. In: *Basic animal nutrition and feeding*, 5th. printing. Pringter O & B Books. pp:14-35,215-249.

- Cone JW and van Gelder AH. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.*;76:251-264.
- Cone JW, van Gelder AH, Visscher GJW and Oudshoorn L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:113-128.
- Cone JW and van Gelder AH. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.*;76:251-264.
- Davies ZS, Mason D, Brooks AE, Griffith GW, Merry RJ, Theodorou MK. 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*;83:205-221.
- De Alba J. 1983. Capítulo 2 Funcionamiento del aparato digestivo. En: Alimentación del ganado en América Latina. 2ª. Edición. Editorial La prensa Médica Mexicana, S.A. pp:28-45.
- Doane PH, Schofield P, Pell AN. 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.*;75:3342-3352.
- Doane PH, Pell AN, Schofield P. 1998. Ensiling effects on the ethanol fractionation of forages using gas production. *J. Anim. Sci.*;76:888-895.
- El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ. 1998. Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining *in vitro* digestibility and gas production. *Can. J. Anim. Sci.*;78:673-679.
- Ensminger ME. 1991. Chapter 4 Digestion. In: Animal Science. 9th Edition. Intertate publisher, inc. pp:89-91.

- Fernandes Abreu J and Martins Bruno-Soares A. 1998. Chemical composition, organic matter digestibility and gas production of nine legume grains. *Anim. Feed Sci. Technol.*;70:49-57.
- Fulton WR, Klopfenstein TJ, Britton RA. 1979. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. I. Adaptation to corn and wheat diets. *J. Anim. Sci.*; 49(3):775-789.
- Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS, Becker K. 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds; a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*;72:261-281.
- Glock RD and DeGroot BD. 1998. Sudden death of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*; 76:315-319.
- González Ronquillo M, Fondevila M, Barrios Urdaneta A, Newman Y. 1998. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilization and the season of growth. *Anim. Feed Sci. Technol.*;72:19-32.
- Groot JCJ, Williams BA, Oostdam AJ, Boer H, Tamminga S. 1998. The use of cumulative gas and volatile fatty acid production to predict *in vitro* fermentation kinetics of italian ryegrass leaf cell walls and contents at various time intervals. *British J. Nutr.*;79:519-525.
- Huntington GB. 1997. Starch by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.*;75:852-867.
- Iantcheva N, Steingass H, Todorov N, Pavlov D. 1999. A comparison of *in vitro* rumen fluid and enzymatic methods to predict digestibility and energy value of grass and alfalfa hay. *Anim. Feed Sci. Technol.*;81:333-344.

- Iwaasa AD, Rode LM, Beauchemin KA, Eivemark S, Morgavi DP, Nsereko V, McAllister TA, Wang AD and Yang WZ. 1999. Evaluating exogenous enzymes and ruminal inoculum effects on cumulative gas production profiles and digestibility characteristics of alfalfa and maize-bases TMR using an automated gas pressure measuring system. Via internet: <http://cnrit.famu.edu/conf/isnh/post-online/post0097/pp.1-10>.
- Johnson RR, Dehority BA, Bentley OG. 1958. Studies on the *in vitro* rumen procedure: improved inoculum preparation and the effects of volatile fatty acids on cellulose digestion. J. Anim. Sci.;17(3):841-850.
- Khazaal K, Dentinho MT, Ribeiro JM, Orskov ER. 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. Anim. Prod.;57:105-112.
- Kreikemeier KK, Stock RA, Brink DR, Britton RA. 1987. Feeding combinations of dry corn and wheat to finishing lambs and cattle. J. Anim. Sci.;65:1647-1654.
- Kreikemeier KK, Harmon DK, Brandt RT, Nagaraja TG Jr, Cochran RC. 1990. Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. J. Anim. Sci.; 68:2130-2141.
- Llamas Lamas Gerardo y Tejada de Hernández Irma. 1990. Capítulo II Técnicas de laboratorio para el análisis de forrajes para rumiantes. En: Manual de Técnicas de Investigación en Rumiología. Primera Edición. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. pp:28-42.

- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD. 1984. Chapter 10 Evaluation of foods, (A) Digestibility. In: Animal Nutrition. Third Edition. Longman Inc., New York. USA. pp:187-201.
- Mathison GW.1996. Effects of processing on the utilization of grain by cattle. Anim. Feed Sci. Technol.;58:113-125.
- Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Technol.;79:321-330.
- Mir Z, Acharya SN, Mir PS, Taylor WG, Zaman MS, Mears GJ, Goonewardene LA. 1995. Chemical composition, *in vitro* gas production and digestibility of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* and alfalfa) forages. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science;46:518-520.
- Mir Z, Acharya SN, Mir PS, Taylor WG, Zaman MS, Mears GJ, Goonewardene LA. 1997. Nutrient composition, *in vitro* gas production and digestibility of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and alfalfa forages. Can. J. Anim. Sci.; 77(1):19-124.
- NCSS 6.0,21. Statistical System for Windows. User's Guide – I. Publicado por: Number Cruncher Statistical Systems, Dr. Hintze K JL., Utah USA. August, 1996.
- Nagadi S, Herrero M, Jessop NS.2000^a. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. Anim. Feed Sci. Technol.;87:231-239.

- Nagadi S, Herrero M, Jessop NS.2000^b. The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. Anim. Feed Sci. Technol.;87:241-251.
- Nocek JE. 1988. *In situ* and other methods to estimate rumian protein and energy digestibility: A review. J. Dairy Sci. 71:2051-2069.
- Nogueira Filho JCM, Fondevila M, Barrios Urdaneta A, González Ronquillo M. 2000. *In vitro* microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. Ani. Feed Sci. Technol.;83:145-157.
- Orkov ER. 1982. Chapter III Dynamics of Nitrogen in the Rumen. In: Protein Nutrition in Ruminants. Academic Press Inc. New York USA. pp.47-57.
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. J. Anim. Sci.; 75:868-879.
- Pell AN and Schofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 76:1063-1073.
- Pell AN, Chen YK and Schofield P. 1999. Rates and extents of soluble carbohydrate digestion. Southwest Nutrition & Managente Conference Proceedings. Feb 25-26. University of Arizona.
- Philippeau C, Le Deschault de Monredon F, Michalet-Doreau B. 1999. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. J. Anim. Sci.;77:238-243.
- Rymer C, Huntington JA, Givens DI.1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. Anim. Feed Sci. Technol.;78:199-213.

- Santos FAP, Huber JT, Theurer CB Swingle RS, Wu Z, Simas JM, Chen KH, Chan SC, Santos J, DePeters J. 1997. Comparison of barley and sorghum grain processed at different densities for lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.*;80:2098-2103.
- Schofield P and Pell AN.1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.*; 73: 3455-3463.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.*;72:2980-2991.
- Shimada A.1983. Capitulo 1 Importancia e Historia de la Nutrición, Capitulo 2 Alimentos: su composición y su evaluación, Capitulo 3 Consumo y digestión de los alimentos. En: Fundamentos de nutrición animal comparativa. pp17-112.
- Stern MD, Bach A, Calsamiglia S. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*;48:185-197.
- Trei J, Hale WH, Theurer B. 1970. Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 30:825-831.
- Valdes EV and Jones GE. 1987. A comparison of *in vitro* and *in vivo* dry matter digestibility techniques for the evaluation of forage quality. *Can. J. Anim. Sci.*; 67:537-576.

- Valentin SF, Williams PEV, Forbes JM, Sauvant D. 1999. Comparison of the *in vitro* gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short- and long-term processes of degradation of maize silage in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*;78:81-99.
- Van Soest PJ. 1983. Part IV Gastrointestinal fermentation. In: *Nutritional Ecology of Ruminant*. Edited by Van Soest PJ. pp:152-229.
- Varel VH and Kreikemeier KK. 1995. Technical note: comparison of *in vitro* and *in situ* digestibility methods. *J. Anim. Sci.*;73:578-582.
- Vitti DMSS, Abdalla ALL, Silva Filho JC, del Mastro NL, Mauricio R, Owen E, Mould F. 1999. Misleading relationships between *in situ* rumen dry matter disappearance, chemical analyses and *in vitro* gas production and digestibility, of *in vitro* gas production and digestibility, of sugarcane bagasse treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. *Anim. Feed Sci. Technol.*; 79:145-153.
- Waldo DR. 1973. Extent and partition of cereal grain starch digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.*;37(4): 1062-1074.
- Xiong Y, Bartle SJ, Preston RL, Meng Q. 1990. Estimating starch availability and protein degradation of steam-flaked and reconstituted sorghum grain through a gas production technique. *J. Anim. Sci.*;68:3880-3885.