



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL

**EFFECTO DEL GRANO DE SORGO GERMINADO Y ENSILADO SOBRE LA  
DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN OVINOS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
**DIANA SUSANA GARCÍA HERNÁNDEZ**

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Luis Corona Gochi

COMITÉ TUTORAL: MC. Francisco Castrejón Pineda  
Dr. German David Mendoza Martínez

México, D.F

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A Dios por ser fuente de mi vida y por inspirarme a seguir siempre luchando sin perder nunca la esperanza y la fe.*

*Dedicado a todas aquellas personas que van caminando por la vida con fe, esperanza, humildad y sobre todo con muchas ganas!*

*A mi mamá quien es el origen de todo lo que soy ahora.*

*A mi hermana y mi sobrino quienes con su amor me alegran los días.*

*A mi pequeño ángel, quien a pesar de no estar físicamente logró llenar de luz aquellos lugares donde no la había y quien me enseñó lo que vale un minuto de vida.*

*Al ser con el que comparto mi vida, quien a pesar de las dificultades no se da por vencido y quien le muestra una sonrisa a la adversidad.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la bendición de la vida y porque es el ser en el que creo y sigo adelante.

A mi angelito que se fue pero dejó una gran lección de vida, una inyección de alegría y muchas más ganas de ir caminando por la vida.

A mi madre quien ha sido un pilar y un ejemplo inmenso en mi vida y que en todo momento me apoya y me brinda su mano. Y sobre todo porque me ha enseñado que a pesar de no tener una profesión se puede salir adelante.

A mi hermana Olga y sobrino Carlitos quienes con su amor me inspiran día a día a crecer más como ser humano.

A Miguel quien en todo momento ha estado a mi lado, gracias por la ayuda que me brindaste para realizar mi trabajo de investigación y sobre todo gracias por estar conmigo en los momentos más críticos de mi vida, por levantarme del peor error de mi vida. Por ser un gran ser humano, un gran compañero de vida y sobre todo por el inmenso corazón que tienes.

Gracias a Minelia y Wilder, por los buenos momentos, por ser buenos amigos, por la gran ayuda que me brindaron y por su apoyo en todo momento.

Gracias a Axel y Fernando por la ayuda que me dieron durante el desarrollo de este trabajo.

A mi tutor Luis Corona Gochi por la confianza que depositó en mí para realizar este trabajo y sobre todo por su disposición y su tiempo dedicado a sus alumnos, y por el gran apoyo que recibí en un momento difícil.

Al comité tutorial, Dr. Germán Mendoza Martínez quien me enseñó que las cosas son más fáciles de las que uno cree y por el valioso tiempo dedicado a este trabajo. Al MC Francisco Castrejón Pineda por la dedicación a este proyecto.

A Fermi por estar siempre detrás de mí, brindándome consejos y por ser una gran amiga.

A QA. Águeda García Pérez, Dr. Rene Rosiles y MVZ Juan Horta quienes me brindaron su tiempo y apoyo para realizar mi trabajo en el laboratorio.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a este trabajo.

A los ovinos que fueron parte de este trabajo, quienes tuvieron un excelente comportamiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), institución de la cual me da orgullo pertenecer

A la Dirección General de personal Académico (DGAPA) – UNAM, por el apoyo al proyecto PAPIIT IN206006 "Evaluación del proceso de reconstitución y ensilaje sobre el valor alimenticio de sorgo, grano [*Sorghum bicolor* L. Moench] en dietas de finalización para bovinos y ovinos"

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de Maestría.*

## RESUMEN

El trabajo consistió en tres experimentos (Ex): **Ex1**, para evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (**NaClO**) sobre la presencia de hongos durante el proceso de germinado del grano de sorgo se elaboraron microgerminados en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 concentraciones de NaClO (0, 0.6 y 0.84 %) x 3 tiempos de exposición (**TE**: 0, 8, 24 horas) al NaClO, sobre los porcentajes de germinación (**%G**) y contaminación de hongos (**%H**), con 4 repeticiones por tratamiento (**tx**). **Ex2**, para determinar el efecto del tiempo de germinación (**G**) y ensilaje (**E**) sobre las fracciones del almidón: soluble (**AS**) e insoluble (**AI**), la digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón (**DRIV**) y características de fermentación: **pH** y % ácido láctico (**LAC**); se elaboraron microsilos en botes de polietileno con capacidad de 1 kg, para evaluar G (0, 1, 3 y 5 días) y E (21, 42 y 63 días). Los microsilos se asignaron a un diseño completamente al azar, con 4 repeticiones por tx: T1= Sorgo entero (**E**), T2= días de germinación - ensilaje (**0G21E**); T3=**1G21E**, T4=**3G21E**, T5=**5G21E**, T6=**0G42E**, T7=**1G42E**, T8=**3G42E**, T9=**5G42E**, T10=**0G63E**, T11=**1G63E**, T12=**3G63E** y T13=**5G63E**. **Ex3**, para evaluar la digestión de nutrientes y fermentación ruminal, se utilizaron 5 ovinos machos pelibuey (38 ±2.84 kg PV ), con cánulas en rumen y duodeno proximal, los cuales se asignaron a un cuadrado latino 5 x 5, para evaluar los tratamientos de sorgo: T1: entero (**E, control**); y los ensilados de sorgo T2: germinado cero días(**G0**); T3: germinado 1 día (**G1**); T4: germinado 3 días (**G3**); T5: germinado 5 días (**G5**). El grano germinado y ensilado fue reconstituido a 30% de humedad, germinados por 0, 1, 3, 5 d y ensilados por 42d. En el Exp1, se observó interacción (P < 0.0001) entre el tiempo de exposición y concentración de NaClO sobre el % H, a mayor concentración de NaClO y tiempo de exposición se observó menor crecimiento de hongos, pero afecta el %G. Por lo que se decidió utilizar 0.6 % de hipoclorito de sodio durante 24 hrs (48 %G y 3.7 % H). En el Exp 2, se observó que el pH del ensilado disminuyó (efecto cúbico P < 0.01) para el día 42. La DRIV fue menor para el testigo (E) en 14.13%, 11.90 %, 10.65 % y 10.24 % (P< 0.01) en comparación con 3G42E, 0G42E, 3G21E y 5G21E respectivamente. En el Exp 3, los tratamientos G1, G3 y G5 presentaron mayor digestión ruminal de la materia orgánica, **DRMO** (P < 0.01, 25.6 %, efecto cuadrático de germinado para G3), digestión ruminal del almidón, **DRALM** (P <

0.01, 25.6%) y fibra detergente neutro **DRFDN** ( $P = 0.17$ , 4.31%) pero menor eficiencia proteica, **EP** ( $P < 0.05$ , 18.65%) y digestión posruminal de la materia orgánica, **DPRMO** ( $P < 0.05$ , 9.88%) respecto a E. G0 presentó mayor DRMO ( $P < 0.05$ , 20 %), DRALM ( $P < 0.01$ , 26.14%), pero menor eficiencia microbiana, ( $P < 0.05$ , 13.20%) y DPRMO ( $P < 0.05$ , 9.88%) respecto a E. El G0 presentó mayor DRALM (efecto cúbico,  $P < 0.05$ ) y EP (efecto cuadrático,  $P < 0.05$ ). G1, G3 y G5 presentaron mayor DRFND ( $P < 0.05$ , 14.63%), pero menor DRALM ( $P < 0.10$ , 5.20%) y eficiencia proteica, EP ( $P < 0.05$ , 18.04%), respecto a SG0E. La digestión posruminal del almidón, **DPRALM** fue mayor para G1 ( $p < 0.05$ , 9.91%) con respecto a G5. Los tratamientos G1, G3 y G5 mostraron mayor digestión total de la materia orgánica, **DTMO** ( $P < 0.05$ , 3.42%), digestión total del almidón, **DTALM** ( $P = 0.18$ , 2.12%) y digestión total del nitrógeno, **DTN** ( $P < 0.10$ , 3.65%) respecto a SE, y éste mayor DTMO ( $P = 0.11$ , 2.61%), digestión total de fibra detergente neutro, **DTFDN** ( $P < 0.10$ , 24.79%) respecto a G0. La DTALM ( $P = 0.13$ , 2.9%) fue mayor para G0 y menor DTFDN ( $P < 0.05$ , 27.62%) respecto a E. Se observa un efecto lineal para germinado en DTALM ( $P < 0.05$ ) en donde al aumentar los días de germinado disminuye el % DTALM. La energía digestible ED ( $\text{Mcal kg}^{-1}$ ) fue mayor para G1, G3 y G5 ( $P < 0.05$ , 4.39%) respecto a E. Los valores de ED ( $\text{Mcal kg}^{-1}$ ) de los granos tratados, con la técnica de reemplazo fueron 3.79, 3.81, 4.01, 3.96 y 3.96 para E, G0, G1, G3 y G5 respectivamente. El pH ruminal fue mayor ( $P < 0.05$ , 5.78%) para G1, G3 y G5 respecto a E. En donde G1 presentó el mayor valor de pH (efecto cuadrático de germinado,  $P < 0.05$ ). Al incrementarse los días de germinación aumenta la proporción molar de acetato (efecto lineal,  $p < 0.01$ ) y disminuye propionato (efecto lineal,  $P < 0.01$ ). La menor concentración de metano se observa en G0 ( $P < 0.01$ , 19.36%) respecto a G1, G3 y G5, ya que al incrementarse los días de germinado se incrementa la producción de metano (efecto lineal,  $P < 0.05$ ). Por lo que se concluye que el proceso de germinación y ensilaje incrementa la digestión del almidón *in vitro* del grano de sorgo debido a una mayor disponibilidad de su fracción insoluble. Los tratamientos con sorgo germinado y ensilado presentaron mayor digestión total de MO, almidón, N, ED y pH ruminal respecto a sorgo entero, debido principalmente a un incremento de la digestión ruminal. Al aumentar los días de germinado

disminuye la digestión del almidón, por lo que el mejor tratamiento en términos de mayor digestión de almidón, pH ruminal y valor energético fue para G1.



## ABSTRACT

Three trials were conducted to evaluate the effect of germinated sorghum on *in vitro* starch digestion and site and extent digestion of nutrients in sheep. Trial 1, to evaluate the effect of the sodium hypochlorite (NaClO) on the presence of mushrooms during the germination process of sorghum grain, 28 micro-germinators was elaborated and randomly assigned to a factorial arrangement, 3 concentrations of NaClO (0, 0.6 and 0.84%) x 3 times of expose (ET: 0, 8, 24 hours) of the grain to NaClO, on the germination percentages (**GP**) and contamination of mushrooms (**MC**), with 4 repetitions for treatment. Trial 2, to determine the effect of time of germination (**GT**) and silage (**ST**) on the fractions of starch: soluble (**SS**) and insoluble (**IS**), the *in vitro* ruminal starch digestion (**IVRSD**) and characteristic of fermentation: pH and % lactic acid(**LAC**); micro-silos was elaborated with polyethylene boats (1 kg), to evaluate the GT (0, 1, 3 and 5 days) and ST (21, 42 and 63 days). The micro-silos was assigned to a random design, with 4 repetitions for treatment: T1 = dry whole sorghum (**DWS**), T2 = days of germination-ensiled (**0G21E**); T3=**1G21E**, T4=**3G21E**, T5=**5G21E**, T6=**0G42E**, T7=**1G42E**, T8=**3G42E**, T9=**5G42E**, T10=**0G63E**, T11=**1G63E**, T12=**3G63E** and T13=**5G63E**.. Trial 3, to evaluate the digestion of nutrients and ruminal fermentation, 5 pelibuey lambs (38 ± 2.84 kg BW) with cannulas in the rumen and proximal duodenum were used, in a latin square 5 x 5. Treatments were: T1:dry whole sorghum (DWS); T2: zero days germinated sorghum and ensiled (**G0**); T3: 1 day germinated and ensiled (**G1**); T4: 2 days germinated sorghum and ensiled (**G3**); T5: 5 days germinated sorghum and ensiled (**G5**), with 5 repetitions for treatment. The grain was reconstituted to 30% of humidity, germinated by 0, 1, 3, 5 d and ensiled for 42d. In trial1, interaction was observed (P <0.0001) between the time of expose and concentration of NaClO on the MC, to increase concentration of NaClO and time of expose reduced growth of mushrooms, but the GP also decreased. For that reason we decided to use 0.6% of sodium hypochlorite during 24 hrs (48 GP and 3.7 MC). In trial 2, pH of the silage decreased (cubic effect P <0.01) for the day 42. The IVRSD was smaller for DWS 14.13%, 11.90%, 10.65% and 10.24% (P <0.01) compared with 3G42E, 0G42E, 3G21E and 5G21E (days germination-ensiled) respectively. In trial 3, G1, G3 and G5 showed bigger ruminal organic matter digestion of, **ROMD** (P <0.01, 25.6%,

quadratic effect for G3), ruminal starch digestion, **RSD** (P <0.01, 25.6%) and ruminal neuter detergent fiber digestion, **RNDFD** (P = 0.17, 4.31%) but smaller protein efficiency, **PE** (P <0.05, 18.65%) and posruminal organic matter digestion, **PROMD** (P <0.05, 9.88%) compared to DWS. G0 presented higher ROMD (P <0.05, 20%), RSD (P <0.01, 26.14%), but lower microbial efficiency, **ME** (P <0.05, 13.20%) and PROMD (P <0.05, 9.88%) compared to DWS. The G0 showed bigger RSD (cubic effect, P <0.05) and PE (quadratic effect, P <0.05). G1, G3 and G5 had higher RNDFD (P <0.05, 14.63%), but smaller RSD (P <0.10, 5.20%) and PE (P <0.05, 18.04%), compared to SG0E. The posruminal starch digestion, PRSD was higher for SG1E (p <0.05, 9.91%) compared to G5. The treatments G1, G3 and G5 showed bigger total digestion of the organic matter, **TOMD** (P <0.05, 3.42%), total starch digestion, **TSD** (P=0.18, 2.12%) and total nitrogen digestion, **TND** (P <0.10, 3.65%) compared to DWS and this higher TOMD (P=0.11, 2.61%), total neuter detergent fiber digestion, **TNDFD** (P <0.10, 24.79%) regarding SG0E. The TSD (P = 0.13, 2.9%) was higher for G0 and TNDFD was lower (P <0.05, 27.62%) compared to DWS. The increasing of germinated days, decrease (lineal effect, P <0.05) TSD. The digestible energy **DE** (McalKg<sup>-1</sup>) values were higher for G1, G3 and G5 (P <0.05, 4.39%) compared to DWS. The ED (Mcalkg<sup>-1</sup>) values for treated grains, with the substitution technique were 3.79, 3.81, 4.01, 3.96 and 3.96 for G0, G1, G3 and G5 respectively. The ruminal pH was bigger (P <0.05, 5.78%) for G1, G3 and G5 compared to DWS. Where G1 presented the biggest pH value (quadratic effect germinated, P <0.05). The increase of germination days increased (lineal effect, p <0.01) the molar proportion of acetate and reduced propionato (lineal effect, P <0.01). The smallest methane concentration was observed in G0 (P <0.01, 19.36%) compared to G1, G3 and G5, the increase of germination days ncreased (lineal effect, P <0.05) methane production. It was concludes that the germination process and ensiling increase the *in vitro* starch digestion of sorghum grain due to a bigger readiness of its insoluble fraction. The treatments with germinated sorghum and ensiled presented bigger total digestion of MO, starch, N, ED and ruminal pH compared to whole sorghum grain, due mainly to an increment of the ruminal digestion. When increasing the days of germination decrease the starch digestión. The best treatment in terms of digestion of starch, ruminal pH and energy value was G1.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 Características generales del grano de sorgo	2
2.1.1 Estructura y composición química del grano de sorgo	3
2.1.2 Propiedades físicas y químicas del almidón	7
2.2 El grano de sorgo en la alimentación de los rumiantes	8
2.3 Métodos de procesamiento de granos	8
2.4 Digestibilidad	10
2.4.1 Pruebas de digestión	11
2.5 Degradación del almidón en el rumen	12
2.5.1 Efecto del tipo de cereal sobre la digestión del almidón en el rumen	13
2.6 Digestión posruminal del almidón	14
2.7 Proceso de germinación	15
2.8 Proceso de ensilaje	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Página

<b>Cuadro 1.</b> Composición química y valor energético de los granos de sorgo y maíz	<b>7</b>
<b>Cuadro 2.</b> Procesos tecnológicos para los granos	<b>9</b>
<b>Cuadro 3.</b> Ingredientes y composición de la dieta experimental	<b>31</b>
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de la varianza para y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de H y G en grano de sorgo	<b>36</b>
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de hongos (H) y germinación (G) en grano de sorgo	<b>36</b>
<b>Cuadro 6.</b> Efectos principales de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de hongos (H) y germinación (G) en grano de sorgo	<b>36</b>
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de la varianza para el efecto del tiempo de germinación y ensilaje del grano de sorgo sobre Materia seca (MS) Almidón: Total (AT), soluble (AS) e insoluble (AI), ácido láctico (AL) digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> del almidón (DRIV)	<b>37</b>
<b>Cuadro 8.</b> Medias de tratamientos para días de ensilado y días de germinación del grano de sorgo	<b>38</b>
<b>Cuadro 9.</b> Efecto del tiempo de germinación y ensilaje del grano de sorgo sobre Materia seca (MS) Almidón: Total (AT), soluble (AS) e insoluble (AI), ácido láctico (LAC) digestibilidad ruminal <i>in vitro</i> del almidón (DRIV)	<b>39</b>
<b>Cuadro 10.</b> Características químicas y físicas de los tratamientos	<b>40</b>
<b>Cuadro 11.</b> Efecto del sorgo germinado y ensilado sobre las características de digestión en ovinos	<b>41</b>
<b>Cuadro 12.</b> Influencia del grano de sorgo germinado y ensilado sobre el pH ruminal, concentración de AGV's y producción de metano	<b>43</b>
<b>Cuadro 13.</b> Resumen de digestibilidad total y ruminal del almidón en ovinos	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Pericarpio del grano de sorgo	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura del grano de sorgo	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Fotografía electrónica del grano de sorgo	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Modificación del endospermo en el grano de sorgo después de 6 h de reconstitución	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Endospermo harinoso de grano de sorgo después de 4 días de germinación	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Endospermo periférico de grano de sorgo después de 4 días de germinación	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Microsilos elaborados con grano de sorgo germinado y ensilado	<b>27</b>
<b>Figura 8.</b> Germinación del grano de sorgo	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Ensilado de grano de sorgo	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Ovino con cánula ruminal	<b>65</b>

<b>ANEXOS</b>	<b>Página</b>
<b>1. COLOCACIÓN DE LAS CÁNULAS</b>	<b>64</b>
1.1. Manejo de animales	64
1.1.2. Manejo preoperatorio	64
1.1.3. Inducción preanestesia	64
1.1.4. Intervención quirúrgica	64
1.1.5. Momento quirúrgico	65
1.2. Colocación de cánula ruminal	65
1.3. Colocación de cánula simple en el duodeno proximal	65
1.4 Manejo postoperatorio	67
<b>2. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL LABORATORIO</b>	<b>68</b>
2.1. Cuantificación de ácido láctico por cromatografía de gases	68
2.2. Cuantificación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases	69
2.3. Determinación de nitrógeno amoniacal en contenido duodenal	71
2.4. Cuantificación de almidón total	72
2.5. Reactividad de la amiloglucosidasa (parte soluble del almidón)	74
2.6. Reactividad de la amiloglucosidasa (parte insoluble del almidón)	76
2.7. Determinación de Purinas (ácidos nucleicos)	79
2.8. Aislamiento de bacterias ruminales por centrifugación diferencial	81
2.9. Cuantificación de cromo	82
2.10. Determinación de tamaño de partícula	84

## 1. INTRODUCCIÓN

El almidón es la principal fuente de energía utilizada en la alimentación de rumiantes en sistemas intensivos de producción. Se ha visto que la utilización óptima del almidón mejora la eficiencia productiva del animal. Las principales fuentes de almidón en la dieta son los granos, los más comúnmente utilizados son el trigo, maíz y sorgo (Theurer, 1986). En México, el principal grano para la ganadería es el sorgo, que cubre un 68% del total del consumo de cereales, mientras que, el maíz cubre solo el 27% (Ramírez *et al.*, 2000).

El grado de digestión del almidón es el principal factor que influye en el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en granos; y varía dependiendo del grano de cereal. Además es modificado por el tipo y grado de procesamiento del grano, tamaño del grano, humedad, temperatura y condiciones de vapor (Rubio *et al.*, 2001; Blas *et al.*, 1995; Xiong *et al.*, 1990). Como ya se conoce, el sorgo debe procesarse para que el almidón pueda ser aprovechado eficientemente por los animales (Brent, 1986). El procesamiento del sorgo aumenta la velocidad y el grado de digestión de los almidones, lo que mejora su valor alimenticio (Stock *et al.*, 1987b).

Los granos procesados han sido utilizados ampliamente en bovinos, pero no en ovinos. Brent (1986) menciona que esta especie presenta mayor capacidad para utilizar eficientemente los granos enteros. Sin embargo, Bowen *et al.* (2007) reportan concentraciones de almidón en heces de ovinos alimentados con sorgo entero de 192 g kg<sup>-1</sup> MS, y al ofrecer sorgo expandido disminuyó (P < 0.05) a 76 g kg<sup>-1</sup> MS. Estos resultados indican que en ovinos hay diferencias en la utilización del almidón debidas al tipo de procesamiento de los granos. La mayor parte de los tratamientos utilizados en los cereales modifican la velocidad de degradación del almidón en el rumen y con ello la proporción digerida en éste órgano y en otros sitios posteriores del tracto digestivo. Esto, puede tener una incidencia importante en la eficiencia de utilización de la dieta y en la respuesta productiva del animal, ya que existe influencia del lugar de digestión sobre el tipo de nutrientes absorbidos (Thomas y Rook, 1981). Los métodos más comunes para el

tratamiento del sorgo son el molido y quebrado. Sin embargo, estos métodos no son suficientes para desdoblar la matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón (Stock *et al.*, 1991). El proceso de hojueleado al vapor, mejora la eficiencia de utilización del almidón. Sin embargo, existe variación debido al tamaño del grano. Una alternativa de tratamiento es la reconstitución y ensilaje del grano, que mejora la digestibilidad y eficiencia de utilización del almidón contenido en el grano de sorgo (Tonroy *et al.*, 1974; Walker y Lichtenwalner, 1977). Por otro lado, durante el proceso de germinación, el grano sintetiza enzimas para hidrolizar a los carbohidratos y proteínas contenidas en el endospermo con la finalidad de brindar moléculas más simples que serán utilizadas para el crecimiento de la plántula. Este proceso puede mejorar el valor nutritivo de la semilla, incrementando la disponibilidad de nutrientes y mejorando su digestibilidad para los animales (Balogun *et al.*, 2000).

Rooney y Pflugfelder, (1986) reportan que la germinación de sorgo incrementó la hidrólisis de la proteína del endospermo (cuerpos de proteína y matriz proteica) y carbohidratos (almidón) por enzimas endógenas. En tanto, la reconstitución sólo promovió un incremento en la solubilidad de proteína y carbohidratos. Sin embargo, Simpson *et al.*, (1985) observaron que la reconstitución sola, fue tan efectiva como el tratamiento aeróbico o anaeróbico para mejorar la digestibilidad del sorgo y el comportamiento productivo de novillos. Diferentes trabajos demuestran que el proceso de germinación mejora la solubilidad de carbohidratos, nitrógeno e incrementa la digestibilidad del grano de sorgo *in situ* (Balogun *et al.*, 2005; Balogun *et al.*, 2006; Wedad *et al.*, 2008).

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Características generales del grano de sorgo**

Un gran número de plantas están incluidas en el género *Sorghum* de la familia de las gramíneas, tienen como características comunes, su resistencia al calor y a la falta de humedad. Esto, ha hecho que fueran conocidos y cultivados desde antes de la era cristiana, principalmente en las zonas secas de Europa.



Su resistencia a la sequía se debe a que sus raíces alcanzan una longitud de hasta 2 m y están sumamente ramificadas, por lo que logran extraer agua de zonas profundas (Compton, 1990).

Los sorgos por su utilización pueden clasificarse en cuatro grandes grupos:

1. Sorgo de grano = *Sorghum bicolor*
2. Sorgo de jarabe = *Sorghum saccharalum*
3. Sorgo de escobas = *Sorghum saccharalum*, var. *technicum*
4. Sorgos de forraje = Sorgo del Sudán (*S. sudanense*) Sorgo de Túñez (*S. virgatum*); Sorgo de Alepo (*S. halepense*) y Sorgo negro (*S. alimum*).

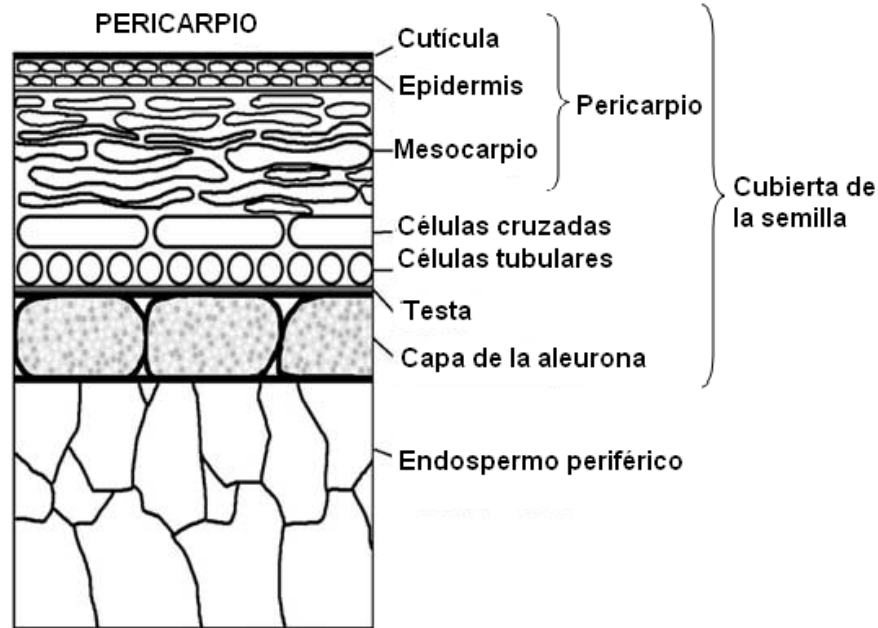
El sorgo es originario de países cálidos, desarrolla bien con temperaturas altas; la temperatura media óptima, durante todo su ciclo es de 26°C. Las plantas a temperaturas inferiores a 15.5°C no se desarrollan bien, llegando a cesar completamente su crecimiento a 0 °C, a temperaturas superiores a 35 °C disminuyen su rendimiento. Para una buena germinación de la semilla, la temperatura debe ser superior a 16°C, sin embargo, germinan en algunos casos, a temperaturas inferiores a 10°C e incluso a 7°C, e s más corto el periodo germinativo cuanto más alta sea la temperatura. Así, a 14°C, las semillas tardan catorce días en germinar. En cambio, si la temperatura es de 21°C solo tardan seis días.

### **2.1.1 Estructura y composición química del grano de sorgo.**

Los componentes estructurales más importantes del grano de sorgo son: el pericarpio, el embrión o germen y el tejido de almacenamiento o endospermo (Figura 1).

El pericarpio es la capa que cubre toda la semilla, representa alrededor del 8 % del peso del grano (Hubbard *et al.*, 1950), y está compuesto por varias capas llamadas epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio es la capa más externa y contiene de 2 a 4 capas de células densas que contienen pigmentos y le confieren color al grano de sorgo. Adyacente al pericarpio se encuentra la capa

llamada testa. En ella se encuentran compuestos fenólicos conocidos como taninos, los cuales le confieren un sabor amargo al grano.

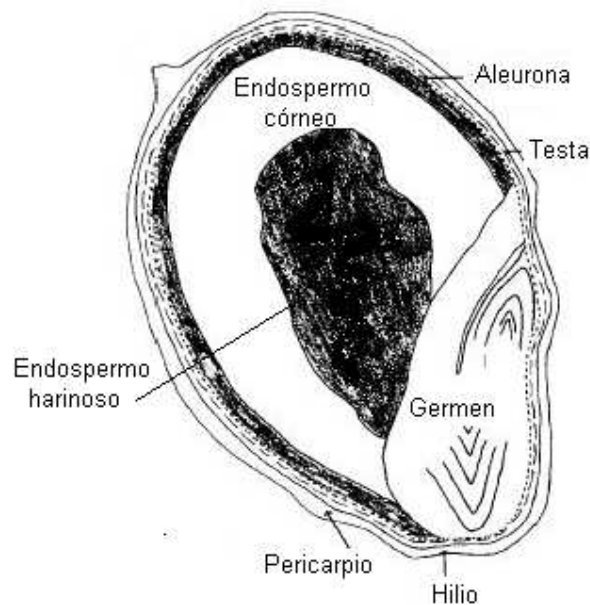


**Figura 1.** Pericarpio del grano de sorgo (Rooney, 1971)

Enseguida se encuentra el endospermo que constituye aproximadamente el 82 % del peso del grano de sorgo (Figura 2), y está constituido por dos porciones bien definidas: la córnea o vítrea y la harinosa; las que a su vez están recubiertas por una zona periférica o sub-aleurona, a la cual se le denomina endospermo periférico (cubierto por una capa llamada aleurona). En ésta parte del grano, están contenidas la mayor cantidad de cuerpos proteicos (prolaminas ó también llamadas kafirinas) y gránulos de almidón más pequeños que los del endospermo corneo. A esta estructuración se debe que el almidón del grano de sorgo no sea disponible a la degradación enzimática (Streeter *et al.*, 1990a). El procesamiento del grano puede modificar esta estructura (Wall, 1970) y por lo tanto incrementar la digestión de los nutrientes (Pieroni, 2000).

Los gránulos del almidón del endospermo periférico y córneo se encuentran embebidos en una densa y continua matriz proteica. El endospermo harinoso del

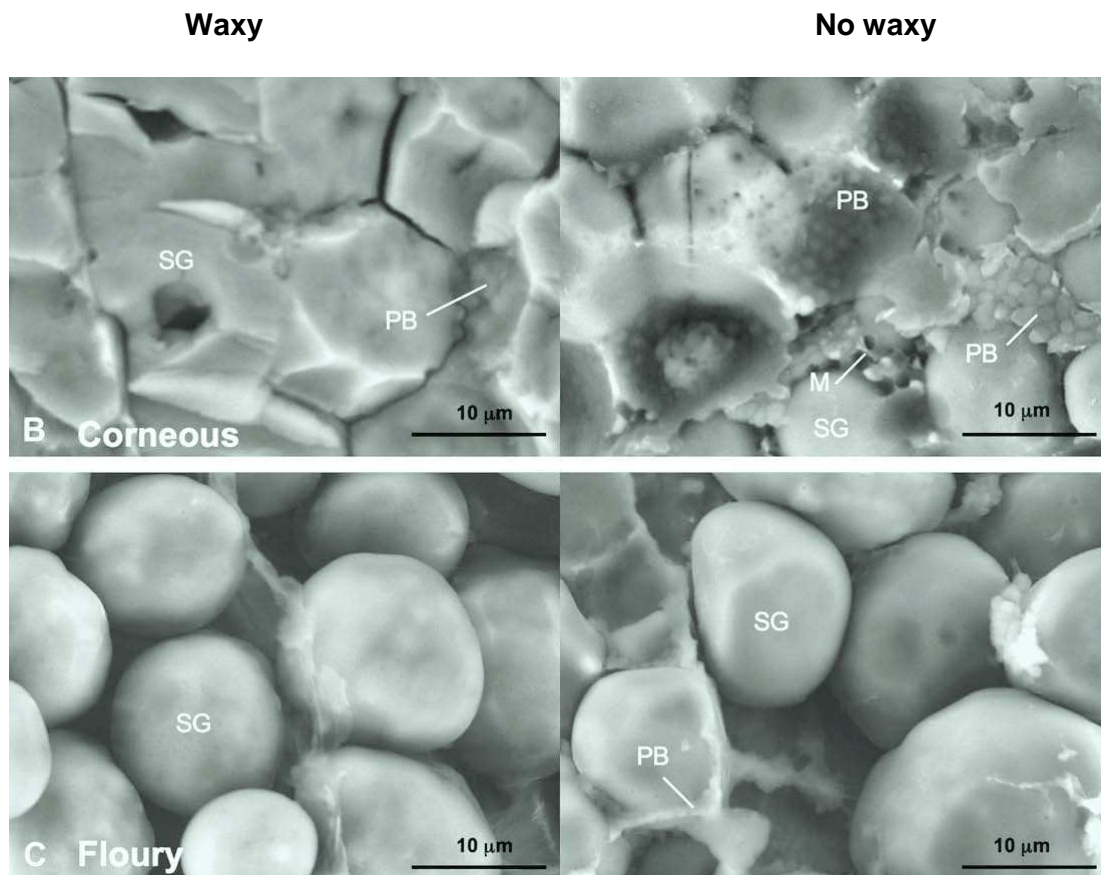
centro del grano posee gránulos del almidón más grandes y en mayor cantidad (Figura 3), que son rodeados por una matriz proteica discontinua y con menor cantidad de cuerpos proteicos (Rooney y Plugfelder, 1986; Kotarski *et al.*, 1992) por lo que los gránulos de almidón contenidos en esta zona son más susceptibles al ataque enzimático y al procesamiento del grano (Huntington, 1997). Finalmente se encuentra el embrión o germen, el cual constituye aproximadamente el 10 % del peso del grano. En el embrión se encuentra gran cantidad de proteína, cenizas y grasa. Además, presenta 2 estructuras: radícula y plumula. La radícula es la primera que emerge en un proceso de germinación y da origen a la raíz.



**Figura 2.** Estructura del grano de sorgo (Rooney 1971)

En cuanto a composición química, el grano de sorgo está compuesto principalmente por:

✓ Carbohidratos. Se pueden identificar 3 clases de carbohidratos. Los almidones, que son el componente químico más abundante y constituye de un 70 – 80% de la materia seca (MS) representa de  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  del peso del grano (Hubbard *et al.*, 1950). Además, se identifican azúcares solubles y carbohidratos estructurales como celulosa, hemicelulosa y pentosanos.



**Figura 3.** Fotografía electrónica del de grano de sorgo. Sección transversal teñida con yodo. B. Endospermo córneo, C. Endospermo harinoso. SG = Gránulo de almidón, PB = Cuerpo proteico, M = Matriz proteica (Wong *et al.*, 2009)

✓ Proteína. El pericarpio, el germen y el endospermo del grano de sorgo contienen 3, 16 y 80 % de proteína respectivamente (Taylor y Schussler, 1986). Estas proteínas corresponden a: kafirinas, glutelinas, albuminas y globulinas. Las glutelinas se encuentran en la matriz proteica y cuerpos proteicos del endospermo del grano de sorgo. En tanto, el germen es rico en albúmina y globulina. Las tres proteínas, glutelinas, albúminas y globulinas son ricas en lisina y otros aminoácidos esenciales. Pero representan un pequeño porcentaje de la composición proteica del grano de sorgo, el cual tiene un mayor contenido de kafirinas presentes en su mayoría en los cuerpos proteicos. Las kafirinas tienen poca cantidad de lisina, treonina y triptófano lo que disminuye la calidad nutricia del grano de sorgo.

✓ El contenido de lípidos en el grano de sorgo oscila entre 2.1 a 5.0%, el 90% son lípidos no polares, 6% glicolípidos y 4% fosfolípidos. Generalmente, el 75 % de material lipídico se encuentra en el escutelo del germen y el resto esta en el endospermo y pericarpio (Selahattin, 2004).

Las vitaminas se encuentran principalmente en la capa de aleurona y en el germen. El sorgo es rico en vitaminas del complejo B. Sin embargo, no es una buena fuente de vitamina B12 y de vitamina C. Es buena fuente de vitamina E. En cuanto a los minerales, la carióspside tiene una buena cantidad de potasio, una cantidad moderada de hierro, magnesio, zinc y cobre. Pero es pobre en sodio y calcio. Los minerales se localizan en el germen, la capa de aleurona y pericarpio (Hubbard *et al.*, 1950). El cuadro 1 muestra la composición de los granos de sorgo y maíz.

**Cuadro 1. Composición química (%) y valor energético (kcal kg<sup>-1</sup>) de los granos de sorgo y maíz\***

Item	Sorgo	Maíz
Proteína	12.7	9.8
Extracto etéreo	3.7	4.6
Fibra cruda	2.8	2.3
Extracto no nitrogenado	78.6	82.0
Energía digestible (kcal kg <sup>-1</sup> )	3450	3600

\*Ibar, 1984

### 2.1.2 Propiedades físicas y químicas del almidón

El almidón se presenta en dos configuraciones moleculares de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina las cuales se unen por puentes de hidrógeno (Rooney y Pflugfelder, 1986). Ambos polímeros se encuentran como cadenas de glucosa unidas por enlace alfa 1,4 glucosídico. La amilosa es un polímero lineal con un promedio de 1500 unidades (Selahattin, 2004) de glucosa con un peso molecular de 150,000 a 1 millón de dalton. Dada por la naturaleza de las uniones glucosídicas, los extremos del polímero son distintos: un extremo no reductor (la glucosa del extremo tiene un grupo hidroxilo libre en C4) y un extremo reductor (la glucosa del extremo tiene un centro de carbono anomérico que está en equilibrio con una cadena abierta de aldehído). La amilopectina es un polímero líneal. Sin embargo, posee dos características estructurales importantes: (1) un esqueleto principal que está compuesto de unidades de glucosa unidas por enlaces alfa 1,4

al igual que en la amilosa y (2) aproximadamente 3,000 ramas conectadas al esqueleto mediante enlaces alfa 1,6 glucosídicos. Los puntos de ramificación se encuentran en promedio cada 15 a 25 residuos de glucosa y su peso molecular es de 10 a 100 millones de dalton (Selahattin, 2004; Mckee y Mckee, 2003). La proporción entre amilosa y amilopectina varía en los cereales y otros alimentos ricos en almidón (Blas, 1995). En el grano de sorgo, la relación de amilosa y amilopectina es de 75 y 25 % respectivamente. La amilosa se disuelve con cierta dificultad en agua, mientras que la amilopectina es la fracción del almidón más soluble en agua (Curá y Krisman, 1990). Por lo que la digestibilidad del almidón es inversamente proporcional al contenido de amilosa, y el sorgo con mayor contenido de amilosa será menos digestible (Rooney y Pfulgfelder, 1986).

## **2.2 El grano de sorgo en la alimentación de los rumiantes.**

En algunos sitios, se ha sustituido la alimentación a base de forraje por el sistema de estabulación y alimentación a base de raciones altas en energía, con éstas prácticas se consigue el desarrollo de los animales en un periodo de tiempo más corto y mejores características de la canal. Por otro lado, debido al actual costo de los cereales, es importante hacer más eficiente su utilización. Por esta razón el estudio de la utilización del almidón es de gran importancia, ya que como se mencionó antes, es el principal componente energético en las dietas de animales en engorda. Para mejorar la utilización de los cereales, es necesario someterlos a algún tratamiento para incrementar su digestibilidad y palatabilidad (Ibar, 1984).

## **2.3 Métodos de procesamiento de granos**

Uno de los objetivos de procesar cereales es aumentar la exposición de los gránulos de almidón y aumentar su susceptibilidad a la degradación enzimática. Muy pocas materias primas son suministradas en mezclas de concentrados sin ser procesadas previamente. Hay una gran variedad de métodos de procesamiento. En el cuadro 2 se presentan los tipos de procesamiento a los que se someten los granos (Hale y Theurer, 1972).

En los tratamientos en frío se logra aumentar la superficie de exposición del grano a la acción enzimática de los microorganismos ruminales, bien por reducción del tamaño de partícula en la molturación o el aplastado (tratamientos secos), o bien

por destrucción de la matriz proteica del endospermo o del pericarpio (tratamientos húmedos con calor).

**Cadro 2. Procesos tecnológicos para los granos**

Temperatura de procesamiento	Procesamiento seco	Procesamiento húmedo
EN FRÍO	Molido Aplastado Quebrado en seco	Maceración Reconstitución y ensilaje
CALIENTE	Micronización Torrefacción Expandido en seco Extrusión	Cocción a presión Trituración al vapor Hojueleado al vapor Granulado (copos)

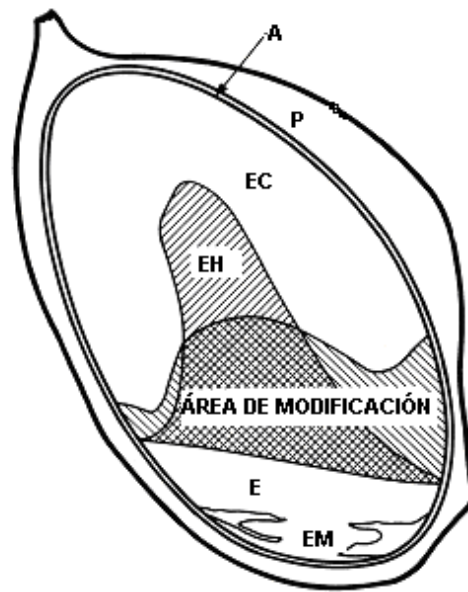
Fuente: (Hale y Theurer,1972)

En los tratamientos en frío se logra aumentar la superficie de exposición del grano a la acción enzimática de los microorganismos ruminales, por la reducción del tamaño de partícula en la molturación o el aplastado (tratamientos secos), o por la destrucción de la matriz proteica del endospermo o del pericarpio (tratamientos húmedos; Figura 4).

La denominación triturado o molido refleja el grado de molturación, y el aplastado, también conocido como laminado, es similar al triturado pero utilizando molino de rodillos en lugar de martillos.

En los tratamientos en caliente, se consigue un cierto grado de gelatinización de los gránulos de almidón. Para ello, es necesaria la aplicación de calor a temperaturas de 140 a 180°C, ya sea por aire seco (expandido), radiación infraroja (micronizado) o flameado (torrefactado), o bien por efecto de la presión y fricción que se consigue al forzar el paso del grano molido a través de una matriz (granulado) o del grano entero a través de un cilindro con superficie rugosa, mediante un tornillo en espiral (extrusión) lo que provoca su molturación y calentamiento. Con frecuencia, tanto el efecto del aplastado como el de la presión

se refuerzan con la aplicación de calor húmedo, mediante el tratamiento previo con vapor, con lo que se consigue un mayor grado de gelatinización del almidón. La cocción previa con vapor a presión es una variante que origina un producto algo más esponjoso y de mayor dificultad para el laminado. El tratamiento previo con vapor es también usual en la granulación y la extrusión, lográndose en este último caso una expansión del grano al detener repentinamente la presión durante la expulsión del material (Rojo, 2001).



**Figura 4.** Modificación del endospermo en el grano de sorgo después de 6 h de reconstitución. A = capa de la aleurona, P = pericarpio, EC = edospermo córneo, EH = endospermo harinoso, E = escutelo, EM = embrión (Glennie, 1983)

## 2.4 Digestibilidad

La digestibilidad es la desaparición del alimento del aparato digestivo. La información sobre digestibilidad se utiliza en nutrición animal para evaluar la utilización de nutrientes.

Es importante resaltar que la digestibilidad es variable, ya que depende de diversos factores como:

- Características propias del alimento dado al animal
- Nivel de consumo del alimento
- Trastornos digestivos



- Frecuencia de alimentación
- Efectos interactivos y asociativos entre alimentos
- Diferencias inherentes entre especies animales.
- Procesado de alimentos

El termino digestión parcial implica que la digestión total en el tracto digestivo puede subdividirse en fracciones que se digieren en las diferentes porciones del tracto digestivo. La información existente sobre ovinos y bovinos indica que alrededor de dos tercios de la materia orgánica y la energía son digeridas en el retículo-rumen y omaso, el resto se digiere en el intestino. Las porciones más fibrosas así como los carbohidratos fácilmente fermentables son digeridos en mayor grado (65 - 90 % de la digestión total) en el rumen (Pond *et al.*, 2004).

#### **2.4.1 Pruebas de digestión**

Las pruebas de digestión se emplean para determinar la proporción de los nutrientes de una dieta o un alimento que son absorbidos en el tracto gastrointestinal.

a) Métodos usuales (Colección total de heces). Los animales se alimentan con una dieta de composición conocida por un periodo de 10 – 15 días, durante los cuales se recolectan todas las heces producidas por los animales en experimentación y se analizan después en busca de los componentes de interés.

b) Métodos con marcadores (Colección parcial de heces)

Cuando no es posible medir la ingestión total o recolección total de heces, se utiliza un segundo método en donde se emplean marcadores, los cuales pueden ser externos (adicionados) o internos (componente de los alimentos) para medir la digestibilidad. Las características deseables de un marcador es que debe ser indigestible, no absorbible, no tóxico y de fácil detección en el excremento.

✓ Marcadores externos. Se ha utilizado comúnmente: óxido de hierro, óxido de cromo y elementos de tierras raras (lantano, cerio, samario, iterbio o disprosio) que se suministran en cantidad conocida y se mezclan con el alimento o en forma directa utilizando cápsulas o papel impregnado del producto.

✓ Marcadores internos. Son aquellos presentes en el alimento y que son digeridos en menor grado o no lo son. La lignina es un ejemplo de este tipo de marcadores. La utilización de lignina presenta varios problemas como una recuperación incompleta y un análisis difícil. También se ha utilizado el sílice, sin embargo su recuperación es difícil y el mayor problema que presenta, es que contamina el suelo (Castellanos *et al.*, 1990).

## **2.5 Degradación del almidón en el rumen**

La degradación de los carbohidratos por los microorganismos del rumen determina la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) que, a su vez, proporcionan del 70 al 80 % de las necesidades calóricas totales del animal hospedador (Church, 1993). En el rumen se fermenta la mayor parte de la fracción digestible del grano (60 al 85%) y la mayor proporción del almidón (más del 90%) si ha sido procesado y expuesto (Guada, 1993).

La mayoría de los carbohidratos consumidos por los rumiantes son polímeros de glucosa, que aparecen en forma de celulosa o almidón. Éste último es hidrolizado a glucosa en el rumen por la acción de amilasas y otras carbohidrasas extracelulares o asociadas a la superficie de las bacterias. Un gran número de bacterias ruminales son capaces de fermentar el almidón y los azúcares. Los géneros más importantes son: *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium*, *Succinivibrio dextrinosolvans* y diferentes especies de *Lactobacilos*. La rapidez con que es hidrolizado el almidón por estas bacterias hasta formar maltosa y algo de glucosa es afectada por la fuente de almidón y el tipo de tratamiento al que haya sido sometido el alimento (Church, 1993). Los protozoarios también juegan un papel importante en el catabolismo de los carbohidratos de reserva, ya que fagocitan los gránulos de almidón y los digieren intracelularmente, por lo que reducen su disponibilidad para otras especies microbianas (Bavera, 2001).

El piruvato es el compuesto intermedio de la fermentación de todos los carbohidratos antes de ser transformados en AGV, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. La proporción de cada producto final, depende del tipo de carbohidrato fermentado, de las especies

bacterianas que intervienen y del ambiente ruminal durante la fermentación. Por ejemplo, los microorganismos amilolíticos dan lugar a una proporción más elevada de ácido propiónico (35 a 45 mol  $100^{-1}$  mol AGV) en el rumen que los fermentadores de celulosa o hemicelulosas (15 a 25 mol  $100^{-1}$  mol AGV) (Bavera, 2001).

La formación de ácido propiónico a partir de piruvato, puede realizarse a través de dos vías metabólicas: vía succinato o vía lactato (piruvato-formato liasa, piruvato ferredoxina oxidorreductasa). La primera de ellas es la más importante en condiciones normales de alimentación. En tanto, la segunda es un 50% menos eficaz desde un punto de vista energético, sólo predomina cuando los animales consumen dietas con altos niveles de concentrados. En estas condiciones, el ácido láctico se acumula en el rumen como consecuencia de un desequilibrio entre las bacterias que producen y las que utilizan el ácido láctico (por ejemplo: *S. ruminantium* o *Megasphaera elsdenii*, menos tolerantes a la acidez ruminal). La acumulación de lactato hace que disminuya el pH del medio ruminal y favorece el crecimiento de las bacterias ácido tolerantes.

La acidosis del contenido ruminal (pH < 5.5), implica efectos significativos sobre la digestión que incluyen: i) reducción de la extensión y velocidad de digestión de la celulosa, ii) descenso del consumo de materia seca y iii) disminución de la relación (acético+butírico)/propiónico (Blas *et al.*, 1995).

La digestión del almidón, es diferente según el tipo de cereal, en cuanto a la proporción de almidón soluble (hidrolizado muy rápidamente), la fermentada en el rumen, y la digerida en tramos posteriores del aparato digestivo; así como por el método de procesamiento del alimento (Blas *et al.*, 1995; Hale, 1972).

### **2.5.1 Efecto del tipo de cereal sobre la degradación del almidón en el rumen**

El factor que parece explicar las diferencias de digestión entre los diferentes granos de cereales, es la matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón. La velocidad de degradación ruminal de la proteína de la matriz determina la velocidad de hidrólisis del almidón, ya que la superficie del almidón en contacto

con las amilasas aumenta a medida que la proteína es degradada. La naturaleza vítrea del sorgo y del maíz está relacionada con su contenido de proteína y la continuidad de la matriz proteica. Así, el maíz y el sorgo tienen una menor proporción de proteínas solubles (albúminas y globulinas) y una mayor proporción de proteínas de reserva (prolaminas y glutelinas). Éstas últimas se caracterizan por una menor solubilidad y una velocidad de hidrólisis más lenta. En consecuencia, la degradabilidad media de las proteínas del trigo o de la cebada es superior a la del maíz o la del sorgo, 70-80 vs. 40-45% (Spicer *et al.*, 1986).

Las bacterias tienden inicialmente a colonizar las regiones situadas entre gránulos de almidón, aprovechando los puntos de ruptura de la matriz proteica. Por lo que, la degradación microbiana del almidón se ve favorecida cuanto mayor es la proporción de endospermo harinoso en el grano de cereal. Por lo tanto, la menor degradabilidad del maíz y el sorgo en comparación con otros granos de cereales es en gran parte debida a la resistencia del endospermo córneo a la colonización bacteriana y a su posterior digestión (Blas *et al.*, 1995).

## **2.6 Digestión post-ruminal del almidón**

El almidón que no es fermentado en el rumen por los microorganismos y los polisacáridos bacterianos llegan al intestino delgado, donde pueden hidrolizarse a glucosa por las amilasas pancreáticas. Posteriormente pasan al ciego e intestino grueso donde pueden ser fermentados por la flora microbiana residente. La digestibilidad intestinal del almidón es inversamente proporcional a la degradabilidad ruminal. Así, la digestibilidad total del almidón de los cereales es generalmente superior al 90%. En el caso del almidón de los granos céreos (maíz y sorgo), el procesamiento tiende a incrementar su digestibilidad total. De acuerdo con Theurer (1986), la digestibilidad total en ganado vacuno es de un 90% como media para los granos enteros, hasta 93% en los granos molidos o aplastados, y 98.5% en los procesados por vapor. Los principales límites a la digestión intestinal del almidón parecen ser el tiempo de digestión y la estructura de las partículas (Blas *et al.*, 1995; Owens *et al.*, 1986).

## **2.7 Proceso de germinación**

Existen diversos cambios metabólicos y gran actividad amilolítica durante el proceso de germinación en las semillas de grano de sorgo, los cuales exponen al almidón y los hacen más susceptible a la degradación microbiana y ataque enzimático (Glennie, 1982).

La semilla consta esencialmente de un embrión, una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado (albumen o endospermo) o en el propio embrión y una cubierta seminal que recubre y protege a ambos. El embrión vegetal una vez formado, puede quedar inactivo si las condiciones ambientales no son propicias para que germine y puede permanecer en dicho estado por un largo tiempo. Si las condiciones del medio son favorables, el embrión reinicia la vida activa y entra en el siguiente estado del desarrollo al germinar la semilla (Rojas, 1993).

Para que tenga lugar la recuperación de la actividad biológica de la semilla o germinación, es necesario que se den las condiciones ambientales favorables como: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno y una temperatura adecuada. Cuando la semilla germina, las células del embrión empiezan a multiplicarse, para luego diferenciarse. De este modo, el embrión se transforma poco a poco en una plántula (García, 2003). En el proceso de germinación se distinguen tres fases:

### 1. Fase de hidratación

La absorción de agua es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria, la síntesis proteica (hidrólisis de las proteínas) y la movilización de las reservas (hidrólisis de los carbohidratos presentes en el endospermo), (Hibberd *et al.*, 1985; Rooney y Pflugfelder, 1986; Balogun *et al.*, 2005).

## 2. Fase de germinación

Representa el verdadero proceso de germinación, es cuando se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la plántula y se reduce considerablemente la absorción de agua, llegando incluso a detenerse.

### Metabolismo de la germinación

Durante el proceso de germinación en las semillas de grano de sorgo existen diversos cambios metabólicos y gran actividad amilolítica más del 90% (Koehler, 1981), lo que expone al almidón y lo hace más susceptible a la degradación microbiana y ataque enzimático (Glennie *et al.*, 1982). Los procesos metabólicos relacionados con la germinación son:

1) Respiración. La semilla seca muestra una escasa actividad respiratoria, aumentando el consumo de O<sub>2</sub> después de iniciada la imbibición (Azcón y Talón, 1993).

2) Movilización de sustancias de reserva. Las semillas contienen cantidades importantes de reservas alimenticias, que permiten su crecimiento y desarrollo. Éstas se encuentran en su mayor parte formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos. Los compuestos de reserva pueden estar almacenados en el embrión o en tejidos extra-embrionarios, principalmente endospermo. Cuando las células están suficientemente hidratadas inicia la germinación, se liberan giberelinas, que por difusión llegan al endospermo y capa de la aleurona, en donde inducen la producción de enzimas hidrolíticas las cuales promueven la movilización de las sustancias de reserva (Barceló *et al.*, 2000).

### *Sustancias de reserva en la germinación*

✓ *Carbohidratos.* El carbohidrato más extendido en las semillas, como principal reserva energética, es el almidón. Sus componentes (amilosa y amilopectina) son hidrolizados por la alfa-amilasa y la beta-amilasa para dar glucosa, que es utilizada por el embrión como fuente de energía (ATP). La

degradación del almidón se incrementa progresivamente durante el proceso de germinación, hasta el agotamiento del mismo (García, 2003).

✓ *Lípidos.* Los lípidos de reserva predominantes en las semillas son los triglicéridos. La degradación y metabolismo de los lípidos se produce en varias fases:

a) Lipólisis de los triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol. Producida en los cuerpos lipídicos por acción de las lipasas que rompen los enlaces éster.

b) Oxidación de los ácidos grasos a acetil CoA y posterior formación de succinato.

c) Conversión de succinato a oxalacetato en las mitocondrias.

d) Formación de sacarosa a partir de oxalacetato en el citoplasma (Azcón y Talón, 1993).

✓ *Proteínas.* La hidrólisis de las proteínas de reserva está catalizada por proteasas. A medida que progresa la germinación, las fracciones proteínicas de reserva se transforman en otras de menor peso molecular, especialmente pequeños péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos liberados pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas en la plántula en desarrollo o para proporcionar energía mediante la oxidación de su esqueleto carbonado. En los cereales, las proteínas se almacenan en la capa de aleurona (Barceló *et al.*, 2000). Glennie *et al.*, (1982) observaron mediante microscopía electrónica los cambios que sufría el grano de sorgo reconstituido durante 6 h y germinado por 4 y 12 días, notando el cambio en el endospermo, modificación en la capa de la aleurona y digestión de la matriz proteica (Figura 5) liberando así los gránulos de almidón, así como la formación de cavidades dentro del mismo (Figura 6) que los hacen más susceptibles a la degradación enzimática.

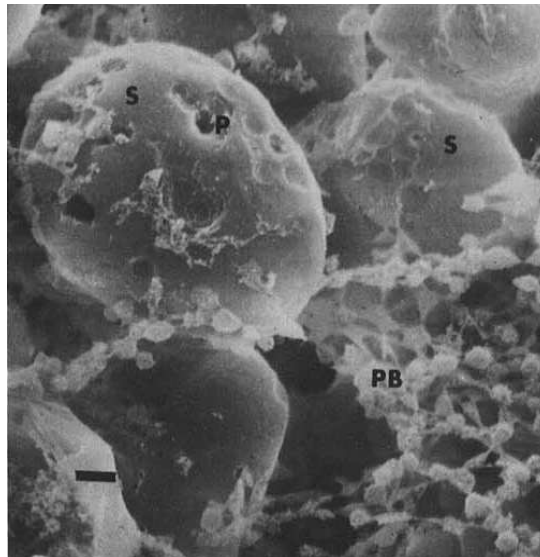
3) Fase de crecimiento. Ésta última fase se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible) y se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (García, 2003).

En ésta última etapa, el embrión ya dispone de las moléculas estructurales y de la energía necesaria para iniciar la síntesis de sus propias moléculas. Finalmente, el

embrión, después de diferenciarse y crecer, se convertirá en una plántula joven (García, 2003).



**Figura 5.** Endospermo harinoso de grano de sorgo después de 4 días de germinación. Muestra las cavidades que se forman en el almidón. S = granulo de almidón, CW = pared celular (Glennie *et al.*, 1982).



**Figura 6.** Endospermo periférico de grano de sorgo después de 4 días de germinación. Muestra cambios en los cuerpos proteicos y las ramas de la matriz proteica. PB = cuerpo proteico, S = granulo de almidón, P = cavidad en el granulo de almidón (Glennie *et al.*, 1982). Bar = 10  $\mu$ m



## 2.8 Proceso de ensilaje

El ensilaje es una técnica de conservación de forraje y grano húmedo que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones de anaerobiosis (Stefanie *et al.*, 1999).

El alimento prensado en el interior del silo experimenta una serie de transformaciones bioquímicas que permiten su conservación en el tiempo, siendo necesarias dos condiciones para lograr un ensilado de alta calidad:

1. Conseguir y mantener en el silo condiciones de anaerobiosis, con el fin de limitar las pérdidas por respiración y evitar el desarrollo de los microorganismos aerobios putrefactivos del alimento ensilado.
2. Impedir el desarrollo de la flora butírica, en particular bacterias del género *clostridium*, las cuales son anaeróbicas, forman endoesporas, y degradan aminoácidos, anhídrido carbónico y ácidos grasos volátiles en ciertos compuestos nitrogenados como las aminas, que pueden ser tóxicas. Esta flora es particularmente sensible a la acidez y ausencia de humedad. Un "ensilaje clostridial" típico muestra un alto contenido de ácido butírico (más de 5 g kg<sup>-1</sup> de MS), un pH alto (>5 en ensilajes con bajo contenido de MS), y alto contenido de amoníaco y aminas (Vos, 1966; McPherson y Violante, 1966). Las técnicas de ensilaje que permiten una caída rápida y significativa del pH evitarán el problema, puesto que tanto el desarrollo de enterobacterias como de clostridios se inhibe con valores bajos de pH (Kleter *et al.*, 1982, 1984; Huchet *et al.*, 1995).

### *Proceso químico biológico del ensilaje*

#### Fase I (aeróbica). Acción de las enzimas vegetales

En el caso de los ensilados, la acción enzimática tiene lugar sobre los procesos respiratorios y sobre la descomposición de los glúcidos y proteínas. El alimento en el silo continúa respirando, absorbiendo oxígeno y eliminando anhídrido carbónico, con desprendimiento de calor. En esta fase el nivel de pH es de 6.5 a 6.0. Esta respiración ocasiona una pérdida de materia seca digestible y sobre todo reduce el contenido de azúcares de la planta, lo que perjudica el desarrollo ulterior de la flora benéfica del ensilado, es decir, la flora láctica. Por ello, es conveniente limitar

la respiración, por lo tanto, llenar y cerrar lo más rápidamente posible el silo (Cañeque y Sancha, 1998).

#### Fase II (fermentación). Acción de los microorganismos

En esta fase, se requiere un medio con ausencia de oxígeno, con azúcares solubles, humedad, y una población adecuada de microorganismos que produzcan el máximo de ácido láctico posible (Stefanie *et al.*, 1999).

Tras la acción de las enzimas de la planta, se produce una rápida multiplicación de los microorganismos presentes en la superficie del alimento a ensilar. Esta microflora se desarrolla en el silo empleando como sustancia nutritiva el jugo liberado por las células vegetales cuando estas mueren por falta de oxígeno. La flora bacteriana comprende diversos géneros como: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellos pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre 5° y 50°C, con un óptimo entre 25° y 40°C. Son capaces de disminuir el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo del género y del tipo de alimento (Cañeque y Sancha, 1998; Stefanie *et al.*, 1999).

#### Fase III (estable). Reducción de la actividad microbiana.

En ella, ocurren pocos cambios, mientras se mantiene un ambiente sin aire. En esta fase la mayoría de los microorganismos reducen lentamente su presencia y algunos se mantienen inactivos.

#### Fase IV (deterioro aeróbico).

Comienza con la apertura del silo y la exposición al aire. Si bien es inevitable, puede presentarse antes de iniciar el suministro, por daño de la cobertura del silo. El proceso de deterioro puede dividirse en dos etapas. En la primera, ocurre una degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por la acción de levaduras y ocasionalmente de bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; donde se constata un aumento de temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje.

La última etapa también incluye la actividad de microorganismos aeróbicos. El deterioro aeróbico ocurre en la mayoría de los ensilados al ser abiertos. La tasa de deterioro depende de la concentración, actividad y concentración de los microorganismos que estén presentes en ese momento (Stefanie *et al.*, 1999).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El principal efecto del procesamiento de los granos es cambiar el sitio de digestión del almidón, pasándolo desde el rumen al intestino con el consecuente incremento en la cantidad de almidón digerido en ambos sitios (Theurer, 1986).

El procesamiento modifica los granos de diferente manera, lo que está en relación con el tipo de grano. De este modo, cualquier mejora en la digestión ruminal del grano por efecto del procesamiento del mismo mejoraría la eficiencia de utilización por parte de los animales (Rooney y Pfulgfelder, 1986).

Un grano entero con el pericarpio intacto es resistente a la degradación por las bacterias ruminales, debido a que es difícil la adhesión bacteriana (McAllister *et al.*, 1994; Nordin y Camping, 1976). La ruptura de la barrera física que recubre los granos por efecto del procesamiento incrementa la superficie de contacto disponible para la unión de los microorganismos y para el ataque enzimático (McAllister *et al.*, 1994). Los procesamientos estándares a los que es sometido el grano de sorgo utilizan calor, y una gran cantidad de investigaciones se enfoca a estos tratamientos térmicos. Sin embargo Balogun *et al.*, (2005) observaron que la germinación y ensilaje es una buena alternativa de procesamiento del grano de sorgo ya que existe una degradación de la matriz proteica, cuerpos proteicos (Glennie *et al.*, 1982) y una exposición de los gránulos de almidón (Sullins *et al.*, 1974; Hale, 1973).

Por lo anterior, y debido a que existe escasa información acerca del efecto de la germinación y del tiempo de ensilaje sobre las características de fermentación de los nutrimentos del grano de sorgo. Esto aplica también para el efecto de la germinación del grano de sorgo y su posterior ensilaje sobre la digestión *in vitro* e *in vivo* del almidón del sorgo en ovinos. Para subsanar esta falta de información se realizó el siguiente trabajo.

#### 4. HIPOTESIS

- 1) Al incrementar la concentración y tiempo de exposición del grano de sorgo al hipoclorito de sodio (NaClO), se reducirá la contaminación por hongos durante el periodo de germinación.
- 2) La digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón de grano de sorgo se incrementará por el tiempo de ensilaje y tiempo de germinación.
- 3) La degradación ruminal, digestibilidad posruminal y total *in vivo* del grano de sorgo se incrementará con el proceso de germinación y ensilaje.

## 5. OBJETIVOS

- 1) Determinar las condiciones optimas de tiempo de exposición (0, 8 y 24 horas) y concentración (0, 0.6 y 0.84 %) del grano de sorgo al hipoclorito de sodio (NaClO) para evitar el crecimiento de hongos durante el proceso de germinación.
- 2) Evaluar el efecto de tiempo de exposición (0, 8 y 24 horas) y concentración (0, 0.6 y 0.84 %) al NaClO sobre el porcentaje de germinación del grano de sorgo.
- 3) Estudiar los efectos del tiempo de germinación (0, 1, 3 y 5 días) y del tiempo de ensilaje (21, 42 y 63 días) sobre las características de fermentación de los ensilados (pH, contenido de ácido láctico y reactividad enzimática del almidón) y sobre la digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón (DRIV).
- 4) Determinar el sitio y grado de digestión del grano de sorgo germinado (0, 1, 3 y 5 días) y ensilado, utilizado como ingrediente principal en dietas de ovinos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### Experimento 1. Prueba con hipoclorito de sodio

Debido a que las condiciones sanitarias pueden modificar la actividad y composición bioquímica de la semilla de sorgo, es importante desinfectarla, ya que puede estar contaminada hasta por 40 géneros de hongos (Cisneros, 2007). Por ello, se decidió utilizar una solución NaClO y se realizó un experimento preliminar en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para esto se depositaron en envases de vidrio con capacidad de 10 mL, 100 semillas de grano de sorgo (36 envases). Estos fueron asignados a los siguientes tratamientos por inmersión del grano: 3 concentraciones (0, 0.6 y 0.84 %) y 3 tiempos de exposición (0, 8 y 24 horas). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones. Terminado el tiempo de tratamiento se enjuagaron con abundante agua de la llave. Posteriormente, con el objetivo de efectuar el proceso de germinación, los granos que fueron expuestos a los tratamientos anteriormente indicados se sembraron en charolas de plástico (36 contenedores) de diámetro inferior de 4 cm y 8 cm de diámetro superior, en donde se utilizó algodón como sustrato. Al quinto día por cada 100 granos sembrados en las charolas se contó el número de granos germinados (%G) y el número de granos contaminados por hongos en cada tratamiento (%H).

#### **Análisis estadístico:**

Los resultados de este experimento se analizaron de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 (concentración de NaClO, %: 0, 0.6 y 0.84) x 3 (tiempo de exposición, h: 8, 16 y 24) con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = valor de la variable de respuesta observado en el i-ésima concentración de cloro, j-ésimo tiempo de exposición y k-ésima repetición.

$\mu$  = efecto de la media general

$A_i$  = efecto de la i-ésima concentración de cloro

$B_j$  = efecto del j-ésimo tiempo de exposición al cloro

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción de la *i*-ésima concentración y el *j*-ésimo tiempo de exposición al cloro

$e_{ijk}$  = efecto del error experimental de la *i*-ésima concentración, *j*-ésimo tiempo de exposición al cloro y *k*-ésima repetición.

Los resultados fueron analizados utilizando el ANOVA con el procedimiento GLM, SAS, para la comparación de medias de tratamiento se utilizó la prueba de Tukey (SAS, 2002).

## **Experimento 2. Digestión enzimática *in vitro* del almidón**

Para evaluar el efecto del tiempo de germinación y proceso de ensilaje sobre la digestibilidad *in vitro* del almidón del sorgo se utilizó la técnica enzimática de Rodríguez *et al.* (2001).

### **a) Proceso de germinación del grano de sorgo**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento 1, se decidió utilizar el tratamiento con NaClO al 0.6 % durante 24 h. Se trataron con NaClO 1.5 kg de grano de sorgo, después se enjuagó con agua de la llave. Posteriormente, se sembraron los granos en 24 charolas de aluminio de 26 x 34 cm (884 cm<sup>2</sup>), éstas fueron recubiertas con polietileno negro para llevar a cabo la siembra y germinación de las semillas durante 0, 1, 3 y 5 días. Las semillas fueron cubiertas con franelas húmedas para evitar su deshidratación. Cada charola fue regada diariamente con 65 mL de agua de la llave.

### **b) Elaboración de los microsilos**

Los microsilos se elaboraron en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para ello, se emplearon botes de polietileno con una altura de 15 cm y un ancho de boca de 9 cm con capacidad de 1 kg aproximadamente. En los botes se depositaron capas de grano previamente germinado (0, 1, 3 y 5 días) por cada 5 cm de espesor aproximadamente, se compactaba el grano con un utensilio casero de madera (mango 15 cm de largo, con un extremo redondo de 7 cm de largo por 6 cm de diámetro). Los botes se cerraron con un tapón de rosca y se sellaron con



silicón para evitar la entrada de aire. El aire que quedó en el bote fue extraído con una bomba de vacío a través de una válvula colocada en las tapas de cada bote (Figura 7).

Los granos fueron ensilados a diferentes tiempos: 21 días, 42 días y 63 días con 4 repeticiones por tratamiento.



**Figura 7.** Microsilos elaborados con grano de sorgo germinado

Los microsilos de grano de sorgo germinado (G) se organizaron en los siguientes tratamientos:

T1, Entero (control) = E

T2, Germinado 0 días, Ensilado 21 días = **0G21En**

T3, Germinado 1 día, Ensilado 21 días = **1G21En**

T4, Germinado 3 días, Ensilado 21 días = **3G21En**

T5, Germinado 5 días, Ensilado 21 días = **5G21En**

T6, Germinado 0 días, Ensilado 42 días = **0G42En**

T7, Germinado 1 día, Ensilado 42 días = **1G42En**

T8, Germinado 3 días, Ensilado 42 días = **3G42En**

T9, Germinado 5 días, Ensilado 42 días = **5G42En**

T10, Germinado 0 días, Ensilado 63 días = **0G63En**

T11, Germinado 1 día, Ensilado 63 días = **1G63En**

T12, Germinado 3 días, Ensilado 63 días = **3G63En**

T13, Germinado 5 días, Ensilado 63 días = **5G63En**

Finalizado el tiempo de ensilaje se destaparon los microsilos, se eliminó la capa superficial del material ensilado (5 cm aproximadamente), se tomaron muestras para medir el pH (Tejada, 1992), y se cuantificó la materia seca (% MS), (AOAC, 1990), ácido láctico (% LAC), almidón total (% AT; Zinn, 1991) almidón soluble 4 h (% AS), almidón insoluble 6 hrs (% AI) y digestibilidad ruminal *in vitro* (% DRIV; Rodríguez *et al.* (2001). Anexo 2.

### **Análisis estadístico:**

Los resultados de laboratorio se analizaron de acuerdo a un diseño completamente al azar mediante el procedimiento GLM de SAS (2002) de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = valor de la variable de respuesta observada en el  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición.  $i = 1, 2, \dots, 13$ ; sorgo tratado,  $j = 1, 2, 3, 4$ ; repeticiones

$\mu$  = efecto de la media general

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$e_{ij}$  = efecto del error experimental en el  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición.

Los resultados fueron analizados utilizando el ANOVA de acuerdo al procedimiento GLM, para la comparación de medias de tratamiento se utilizó la prueba de Tukey (SAS 2002). Los días de germinado y ensilaje se analizaron por polinomios ortogonales, para lo cual se calcularon los coeficientes para días de germinado mediante el procedimiento IML (interactive matrix language) de SAS (2002).

### **Experimento 3: Prueba de digestibilidad *in vivo***

Con base en los resultados obtenidos en el experimento 2, (utilizando el sorgo germinado a 0, 1, 3 y 5 días, y 42 días de tiempo de ensilaje que presentó los mejores resultados de digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón, se realizó una

prueba de digestibilidad en ovinos en el Centro de Enseñanza Práctica, e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA, FMVZ-UNAM), El centro se encuentra en Av. Cruz Blanca No. 486, pueblo San Miguel Topilejo, delegación Tlalpan, C.P. 14500 México, D.F., en el kilómetro 28.5 de la carretera federal México – Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° longitud oeste con una altitud de 2760 m, el clima de la región es c (w) b (ij) semifrío semihúmedo con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm anuales y una temperatura promedio de 19°C.

### **Elaboración de ensilados para la prueba *in vivo***

Se utilizaron 320 kg de sorgo, los cuales fueron remojados durante 24 hrs con NaClO al 0.6% para evitar la proliferación de hongos durante el proceso de germinación. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua y se pusieron a germinar en un área destinada para ello. Se utilizaron 80 kg de grano por cada tratamiento: germinado 0 días y ensilado (**G0**), germinado 1 día y ensilado (**G1**), germinado 3 días y ensilado (**G3**) y germinado 5 días y ensilado (**G5**).

Se colocaron para germinar 40 kg de grano de sorgo en un área de 6 m<sup>2</sup>, con una profundidad de grano de 6 cm teniendo así un densidad de siembra de 6.67 kg/m<sup>2</sup> o 111.11 kg/m<sup>3</sup> (peso/volumen) (Figura 8).



**Figura 8.** Germinación del grano de sorgo.

La siembra se realizó en el mes de noviembre, la temperatura promedio dentro del área donde se llevó a cabo la germinación que duró 5 días fue de 23 °C, con una variación de 10 a 32°C, entre mañana – tarde. El porcentaje de humedad relativa promedio fue de 43 %, la variación entre mañana y tarde fue de 75 a 22 %. Finalizado el tiempo de germinación correspondiente a cada tratamiento, el grano germinado se ensiló en tambos de plástico con capacidad de 200 litros dentro de los cuales se colocaron bolsas negras de plástico, para posteriormente colocar el grano de sorgo por cada tratamiento (**G0, G1, G3 y G5**). Con la finalidad de evitar la entrada de aire, y conseguir un buen ensilado, cada 20 kg introducido en la bolsa era compactado con un pisón de mano de 5 kg (proceso similar al mencionado en la prueba con microsilos). Una vez introducido un total de 80 kg por tratamiento se cerraron las bolsas con un nudo y se colocaron costales de grano de sorgo seco encima de ellas. Teniendo así un total de 4 tambos éstos fueron sellados y se dejaron ensilar 42 días (Figura 9).



**Figura 9.** Ensilado de grano de sorgo

### **Animales y adaptación a la dieta**

Para esta prueba se utilizaron cinco ovinos machos pelibuey ( $38 \pm 2.84$  kg), a los cuales se les colocaron cánulas ruminales y de tipo “T” en el duodeno proximal (Anexo 1). Los animales fueron asignados a un arreglo de cuadrado latino 5 x 5, para recibir los tratamientos experimentales: **E, control, G0, G1, G3 y G5**.

Cada ovino fue alojado en jaulas metabólicas con un espacio vital de 1 m<sup>2</sup> aproximadamente, con comedero y bebedero individual. Se les alimento con base

al 2.2 % de su peso vivo. Fueron adaptados paulatinamente a la dieta alta en granos (Cuadro 3) así como al horario de comida, el cual fue 2 veces por día cada 12 hrs (8:00 y 20:00 h). La adaptación a la dieta se inició proporcionando 25 % grano de sorgo y 75 % ensilado de maíz; en el siguiente periodo la dieta fue de 50 % grano y 50 % ensilado de maíz. Finalmente la última etapa de adaptación consistió en 75 % grano y 25 % ensilado de maíz. Cada periodo de adaptación duró 7 días. Concluida la adaptación al grano, se inició el periodo para adaptar a los animales a los diferentes tratamientos. Dicho periodo tuvo una duración de 10 días.

**Cuadro 3. Ingredientes y composición de la dieta experimental**

<b>Ingredientes</b>	<b>% BS</b>
<b>Dieta base</b>	
Gano de sorgo (tratamientos)	72.00
<b>Complemento</b>	
Heno de alfalfa	6.00
Heno de avena	12.00
Melaza de caña	6.00
Urea	1.00
Bicarbonato de Sodio	0.50
Fosfato dicálcico	0.20
Sal común	0.50
Óxido de magnesio	0.20
Carbonato de calcio	1.15
Óxido de cromo <sup>1</sup>	0.40
Premezcla mineral	0.05
<b>Composición de la dieta<sup>2</sup></b>	
% PC	10.87
% FND	25.04
EM Mcal kg <sup>-1</sup>	2.63
ENm Mcal kg <sup>-1</sup>	1.60
Eng Mcal kg <sup>-1</sup>	1.04
%Ca	0.61
%P	0.29

<sup>1</sup>Se utilizó como marcador de la digesta

<sup>2</sup>Composición de la dieta en base a NRC, 1985

### **Toma de muestras**

Para estimar la digestibilidad ruminal con óxido de cromo (Anexo 2), finalizando los diez días de adaptación a los tratamientos de grano de sorgo se tomaron directamente del ano muestras de heces (100 g de heces frescas) y contenido duodenal (100 mL/muestreo) dos veces al día, por cuatro días consecutivos a intervalos de 12 h en los siguientes horarios: **día 1** - 6:00 y 18:00 h; **día 2** - 7:00 y 19:00 h; **día 3** - 8:00 y 20:00 h, **día 4** - 9:00 y 21:00 h. El último día de muestreo de cada periodo (5 periodos) se tomaron muestras de contenido ruminal 4 hrs post consumo. Las muestras de heces se depositaron en una bolsa de plástico de 1 kg y fueron conservadas en congelación para posteriormente, tener una muestra compuesta de los 4 días de muestreo por periodo/animal. Las muestras individuales de contenido duodenal se colectaron en frascos de polietileno con capacidad de 100 mL. Con el propósito de formar muestras compuestas se depositaron los 100 mL colectados en frascos de plástico de 1 L de capacidad los cuales se mantuvieron en congelación.

Para la extracción de líquido ruminal se utilizó una bomba de vacío (Cole Parmer Instrument, Vernon Hill, IL.). La muestra obtenida se filtro a través de 3 capas dobles de gasa y se le midió el pH (Orion 261S, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.). Se tomaron 40 mL de contenido ruminal filtrado y se depositó en una bolsa de plástico en donde fue mezclado con 10 mL de ácido metafosfórico al 25 % (peso/volumen) con la finalidad de preservar los AGV's, las muestras se conservaron en congelación.

En cada periodo se colectó una muestra de la dieta para cada tratamiento (E, G0, G1, G3, G5) y de complemento. Así, se colectaron 25 muestras de alimento, 25 muestras de contenido duodenal, 25 muestras de heces, 15 muestras de contenido ruminal y 5 muestras del complemento el cual incluía óxido de cromo como marcador, dando así un total de 80 muestras. El último día del último periodo experimental, se colectaron muestras de contenido ruminal de todos los ovinos. Éstas se mezclaron y del resultante se obtuvo una alícuota para aislamiento de bacterias ruminales por centrifugación diferencial (Bergen *et al.*, 1968; Anexo 2).

## **Análisis de laboratorio**

Las muestras de alimento, complemento, contenido duodenal y heces fueron deshidratadas en estufa de aire forzado a 50 °C (Rios Rocha mod. HS\_62), una vez deshidratadas se molieron en un molino (Willey, 1 mm tamaño de criba) fueron depositadas en frascos de plástico para posteriormente realizar los siguientes análisis:

- a) Grano de sorgo (E, G0, G1, G3, G5): determinación del tamaño de partícula, (adaptada de Baker y Hermann, 2002). Se utilizó un agitador W.S. TYLER 8570 (Mod. RX-812) con cribas de número 4 (4.76 mm), 5 (4.00 mm), 6 (3.36 mm), 7 (2.83 mm), 8 (2.38mm) y 10 (2.00 mm). El tiempo de agitación fue de 10 min por muestra (Ensor, 1970).
- b) Grano de sorgo, complemento, contenido duodenal y heces: materia seca (deshidratado en estufa a 50°C), cenizas, nitrógeno total Kjeldahl (AOAC, 1990), almidón (Zinn, 1990); fibra detergente neutro (corregida por cenizas; Chai y Uden, 1988).
- c) Complemento, contenido duodenal y heces: cuantificación de de cromo (Hill y Anderson, 1958).
- d) Grano de sorgo, complemento y heces: energía bruta (EB) (utilizando una bomba calorimétrica adiabática PARR®, Gallenkamp, Automatic Adiabatic Bomb).
- e) Contenido duodenal: purinas (Zinn, 1986) y N- amoniacal (Galyean, 1997).

## **Cálculos de parámetros**

- ✓ La Materia Orgánica Microbiana (MOM) y el Nitrógeno Microbiano (NM) que salen del abomaso fueron estimados utilizando las purinas como marcador microbiano (Zinn, 1986).
- ✓ La Materia Orgánica Fermentada (MOF) en el rumen fue considerada igual a la ingestión de MO menos la diferencia entre la cantidad de MO y MOM que llegó a duodeno. El Nitrógeno (N) alimenticio de sobrepaso al intestino delgado se estimó igual al N total que sale del abomaso menos el N-amoniacal y N-Microbiano incluyendo cualquier contribución endógena.

✓ El valor comparativo de la energía digestible (ED, Mcal kg<sup>-1</sup>) de los tratamientos experimentales se estimó mediante la técnica de remplazo (Corona y Zinn, 2005). Las dietas fueron idénticas en composición salvo el sorgo tratado que reemplaza al sorgo entero en una proporción igual, por lo que se consideró al sorgo entero (**E**) con 3.79 Mcal kg<sup>-1</sup> de ED de acuerdo al NRC (1985).

Las diferencias observadas en el contenido de la ED de las dietas son un resultado directo de las diferencias del contenido de la ED de los tratamientos que reemplazan al E. El valor de ED de los tratamientos probados se calculó de la siguiente manera: ED, Mcal kg<sup>-1</sup> del cereal prueba = [(ED observada para cada una de los tratamientos [(G0, G1, G3 y G5) – ED observada para la dieta con E)/0.72] + 3.79.

✓ Las características de fermentación (AGV's y producción de metano fueron estimadas de acuerdo a las fórmulas de Wolin (1960).

✓ La determinación de tamaño de partícula fue calculada de acuerdo con Baker y Hermann (2002) (Anexo 2.10).

### **Análisis estadístico:**

Para los resultados de la prueba *in vivo*, se analizaron de acuerdo a un diseño de cuadrado latino 5 (tratamientos) x 5 (repeticiones) y se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij(k)} = \mu + A_i + P_j + T_k + E_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  = media general.

$A_i$  = efecto del i-ésimo animal

$P_j$  = efecto del j-ésimo periodo

$T_k$  = efecto del k-ésimo tratamiento

$E_{ijk}$  = error aleatorio del i-ésimo animal, j-ésimo periodo y k-ésimo tratamiento



Las diferencias entre medias se analizaron mediante los siguientes contrastes: E vs G0; E vs G1, G3 y G5; G0 vs G1, G3 y G5; G1 vs G5. Los días de germinado se evaluaron por polinomios ortogonales, para lo cual se calcularon los coeficientes mediante el procedimiento IML de SAS (2002).

## **7. RESULTADOS**

### **Experimento 1: Prueba con hipoclorito de sodio**

#### **a) Inhibición del crecimiento de hongos**

Se encontró una interacción ( $P < 0.0001$ ) entre el tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio sobre el porcentaje de hongos (**% H**) presentes en la semilla. En cuanto a tiempo de exposición hubo menor crecimiento de hongos conforme fue aumentando el tiempo de exposición al tratamiento. Sin embargo, esta relación (tiempo de exposición x concentración) no afectó de la misma manera al porcentaje de germinación en la semilla (Cuadro 5) ya que este proceso no se vio afectado por la concentración de cloro, debido a que se observó un porcentaje de germinación similar en las distintas concentraciones de NaClO. Como se observa en el cuadro 6, existió diferencia en cuanto al porcentaje de germinación (**%G**) y hongos si la semilla es tratada con NaClO, ya que la germinación de la semilla se vio afectada, la concentración cero presentó mejor cantidad de semillas germinadas con respecto a las que estuvieron expuestas a 0.84 % de NaClO donde las semillas germinaron en menor cantidad. De manera contraria, se vio afectado el crecimiento de hongos, en donde en la concentración cero obtuvo mayor crecimiento de hongos, comparado con el tratamiento de 0.84 % de NaClO, el cual presentó menor crecimiento de hongos. Debido a que se consideró a 48 % como un buen porcentaje de germinación y 3.7 % de crecimiento de hongos como bajo, se decidió utilizar el tratamiento con 0.6 % de hipoclorito de sodio durante 24 h, para la realización del experimento 2.

**Cuadro 4. Análisis de la varianza para y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de H y G en grano de sorgo**

Fuente de variación	GL	CM	F	P
Modelo	8	45.10	5.63	0.0001
% G	2	19.99	23.95	0.0001
% H	2	12.47	14.94	0.0001
% G * % H	4	12.63	3.15	0.0003
Error del CM	27	11.27	0.41	
Total	35	56.37		

**Cuadro 5. Efecto de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de hongos (H) y germinación (G) en grano de sorgo**

CONCEPTO	CONCENTRACIÓN DE NaClO (%)									EEM <sup>1</sup>
	0			0.6			0.84			
	TIEMPO (h)			TIEMPO (h)			TIEMPO (h)			
	8	16	24	8	16	24	8	16	24	
%G <sup>2</sup>	43.5 <sup>a</sup>	39.25 <sup>ab</sup>	25.5 <sup>bc</sup>	47.5 <sup>a</sup>	52.75 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	54.25 <sup>a</sup>	40.5 <sup>ab</sup>	19.25 <sup>c</sup>	0.06
%H <sup>2</sup>	17 <sup>a</sup>	8.5 <sup>ab</sup>	5.7 <sup>b</sup>	9.2 <sup>ab</sup>	8.7 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>b</sup>	8.5 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.03

<sup>a,b,c</sup> Literales distintas entre hileras indican diferencias significativas (P < 0.05)

<sup>1</sup>EEM = error estándar de la media

<sup>2</sup>Interacción concentración de NaClO x tiempo de exposición (P < 0.0001)

**Cuadro 6. Efectos principales de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre la presencia de hongos (H) y germinación (G) en grano de sorgo**

CONCEPTO	% NaClO			TIEMPO (h)			EEM <sup>1</sup>
	0	0.6	0.84	0	16	24	
%G	48.42 <sup>a</sup>	44.17 <sup>a</sup>	30.92 <sup>b</sup>	36.08 <sup>c</sup>	49.42 <sup>d</sup>	38 <sup>c</sup>	0.12
%H	11.58 <sup>a</sup>	5.92 <sup>b</sup>	3.33 <sup>b</sup>	10.42 <sup>c</sup>	7.25 <sup>c</sup>	3.17 <sup>d</sup>	0.03

<sup>a,b,c</sup> Literales distintas entre hileras indican diferencias significativas (P < 0.05)

<sup>1</sup>EEM = error estándar de la media

## Experimento 2: Digestión enzimática *in vitro* del almidón

En el Cuadro 8 se puede observar que el pH disminuyó (efecto lineal,  $P < 0.01$ ) al incrementarse los días de ensilaje y germinado. No se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos para %AT y %AS. Respecto a la concentración de LAC, se encontró que para 21 y 42 d de ensilaje, al incrementarse los días de germinación, incrementó ( $P < 0.05$ ) su concentración, por el contrario al incrementarse los días de ensilaje, disminuyó la cantidad de LAC (efecto lineal  $P < 0.05$ ). Como se observa en el cuadro 9, el valor del %AI para E fue menor (35%,  $P < 0.05$ ), excepto para 42-1 y 63-1 que tuvieron 41%. La DRIV fue menor ( $P < 0.05$ ) para el testigo (sorgo entero) en 14.13%, 11.90 %, 10.65 % y 10.24 % ( $P < 0.01$ ) respecto a 3G42En, 0G42En, 3G21En y 5G21En, respectivamente.

**Cuadro 7. Análisis de la varianza para el efecto del tiempo de germinación y ensilaje del grano de sorgo sobre Materia seca (MS), Almidón Total (AT), soluble (AS) e insoluble (AI), ácido láctico (AL) y digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón (DRIV).**

Fuente de variación	GL	CM	F	P
pH	16.05	1.33	141.45	0.0001
%MS	27.75	2.31	383.86	0.0001
%AT	3.20	0.26	1.57	0.1427
%AS	0.26	0.02	1.72	0.0987
%AI	4.06	0.33	3.84	0.0007
%LAC	5.84	0.48	92.11	0.0001
%DRIV	2.20	0.18	3.32	0.0022
Error del CM	39			
Total	51			

**Cuadro 8. Medias de tratamientos para días de ensilado y días de germinación del grano de sorgo.**

Concepto <sup>2</sup>	Tratamientos <sup>1</sup>									
	Tiempo de ensilaje (días)				Tiempo de germinación (días)					EEM <sup>3</sup>
	E	21En	42En	63En	E	0G	1G	3G	5G	
pH <sup>4,5</sup>	6.12	4.29	4.11	4.19	6.12	4.36	4.30	4.17	3.96	0.004
%MS <sup>4,5</sup>	95.00	67.62	68.18	68.93	95.00	70.00	68.66	68.33	65.91	0.001
%AT	70.00	71.00	68.68	72.62	70.00	68.41	71.33	71.83	71.50	0.023
%AS	7.25	7.87	7.87	7.31	7.25	7.25	7.16	8.08	8.25	0.001
%AI <sup>4,5</sup>	35.00	44.50	43.37	43.18	35.00	43.00	42.08	46.00	43.66	0.010
%LAC <sup>4,5</sup>	0.00	1.23	0.87	0.85	0.00	0.81	0.96	1.04	1.13	0.102
%DRIV <sup>4,5</sup>	61.00	66.87	67.06	65.25	61.00	66.91	64.91	67.5	66.25	0.007

<sup>1</sup>E = sorgo entero, 0G = sorgo germinado 0 días y ensilado (En), 1G = sorgo germinado 1 día y ensilado, 3G = Sorgo germinado 3 días y ensilado, 5G = sorgo germinado 5 días y ensilado

<sup>2</sup>MS = materia seca, AT = almidón total, AS = almidón soluble, AI = almidón insoluble, LAC = ácido láctico, DRIV= Digestibilidad ruminal *in vitro*

<sup>3</sup>EEM = Error estándar de la media

<sup>4</sup>Efecto lineal tiempo de ensilaje (P < 0.01)

<sup>5</sup>Efecto lineal tiempo de germinación (P < 0.01)

**Cuadro 9. Efecto del tiempo de germinación y ensilaje del grano de sorgo sobre Materia seca (MS)  
Almidón: Total (AT), soluble (AS) e insoluble (AI), ácido láctico (LAC) y digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón (DRIV).**

ENSIL (días)	21					42					63					
GERM (días)	E	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	EEM <sup>1</sup>		
pH	6.12 <sup>a</sup>	4.30 <sup>b</sup>	4.70 <sup>c</sup>	4.30 <sup>b</sup>	3.84 <sup>d</sup>	4.39 <sup>b</sup>	4.01 <sup>de</sup>	4.03 <sup>de</sup>	4.01 <sup>de</sup>	4.39 <sup>b</sup>	4.19 <sup>be</sup>	4.17 <sup>be</sup>	4.04 <sup>de</sup>	0.001		
%MS	95.00 <sup>a</sup>	69.00 <sup>bcd</sup>	68.00 <sup>cde</sup>	67.75 <sup>de</sup>	65.75 <sup>fg</sup>	71.00 <sup>h</sup>	68.25 <sup>cde</sup>	68.50 <sup>cde</sup>	65.00 <sup>g</sup>	70.25 <sup>bh</sup>	69.75 <sup>ceh</sup>	68.75 <sup>bcde</sup>	67.00 <sup>ef</sup>	0.008		
%AT	70.00	69.00	70.50	73.75	70.75	65.50	71.25	66.75	71.25	70.75	72.25	75.00	72.50	0.024		
%AS	7.25	7.00	7.25	8.00	9.25	7.50	7.50	9.00	7.50	7.25	6.75	7.25	8.00	0.001		
%AI	35.00 <sup>a</sup>	43.00 <sup>b</sup>	43.00 <sup>b</sup>	47.50 <sup>b</sup>	44.00 <sup>b</sup>	43.25 <sup>b</sup>	41.25 <sup>ab</sup>	45.50 <sup>b</sup>	43.50 <sup>b</sup>	42.75 <sup>b</sup>	41.50 <sup>ab</sup>	45.00 <sup>b</sup>	43.50 <sup>b</sup>	0.012		
%LAC	0.00 <sup>a</sup>	1.01 <sup>bc</sup>	1.16 <sup>bd</sup>	1.28 <sup>de</sup>	1.46 <sup>e</sup>	0.65 <sup>f</sup>	0.84 <sup>cg</sup>	0.97 <sup>c</sup>	1.01 <sup>bc</sup>	0.76 <sup>fg</sup>	0.87 <sup>cg</sup>	0.87 <sup>cg</sup>	0.91 <sup>cg</sup>	0.000		
%DRIV	61.00 <sup>a</sup>	66.50 <sup>ab</sup>	66.25 <sup>ab</sup>	67.50 <sup>b</sup>	67.25 <sup>b</sup>	68.25 <sup>b</sup>	64.25 <sup>ab</sup>	69.75 <sup>b</sup>	66.00 <sup>ab</sup>	66.00 <sup>ab</sup>	64.25 <sup>ab</sup>	65.25 <sup>ab</sup>	65.50 <sup>ab</sup>	0.007		

<sup>1</sup>EEM= Error estándar de la media

a,b,c,d,e,f,g,h Letras distintas en una hilera indican diferencia (p<0.05)

### Experimento 3: Prueba de digestibilidad *in vivo*

Para el tamaño de partícula se obtuvieron los valores del cuadro 10 para los diferentes tratamientos, en donde no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos.

**Cuadro 10. Características químicas y físicas de los tratamientos**

Nutriente	Tratamientos <sup>1</sup>					EEM <sup>2</sup>
	SE	SG0E	SG1E	SG3E	SG5E	
% AT <sup>3</sup>	71.21	72.86	68.12	71.10	71.60	
%N <sup>4</sup>	1.33	1.35	1.34	1.33	1.31	
%FND <sup>5</sup>	7.06	5.61	5.34	5.54	5.12	
% H <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	
% G <sup>7</sup>	0	35	38	42	54	
<b>Tamaño de partícula (mm)</b>						
4.76	0	0	0	0	0	0.00
4.00	0.01	0	0	0	0	0.00
3.36	21.06	32.81	26.49	26.94	34.55	0.13
2.83	76.35	64.96	71.15	70.64	63.79	0.12
2.38	1.36	1.11	1.21	1.27	0.87	0.00
2.00	0.93	0.78	0.84	0.65	0.57	0.00
MGTP, $\mu\text{m}$ <sup>8</sup>	3160	3225	3295	3196	3243	37.0
DEG <sup>9</sup>	1.15	1.17	1.15	1.62	1.16	0.00
Partículas/g	27.4	26.31	26.19	26.63	25.41	0.81
SA $\text{cm}^2/\text{g}$ <sup>10</sup>	17.18	17.04	16.88	17.04	16.80	0.08

<sup>1</sup>E = Sorgo entero, GO = Sorgo germinado 0 días y ensilado, G1 = Sorgo germinado 1 día y ensilado, G3 = Sorgo germinado 3 días y ensilado, G5 = Sorgo germinado 5 días y ensilado

<sup>2</sup>EEM = error estándar de la media

<sup>3</sup>AT=Almidón total

<sup>4</sup>N=Nitrógeno

<sup>5</sup>FND=Fibra neutro detergente

<sup>6</sup>H= Hongos

<sup>7</sup>G=Germinación

<sup>8</sup>Media geométrica del tamaño de partícula.

<sup>9</sup>Desviación estándar geométrica.

<sup>10</sup>Área de superficie.

**Cuadro 11. Efecto del sorgo germinado y ensilado sobre las características de digestión en ovinos**

	Tratamientos <sup>1</sup>					
	E	GO	G1	G3	G5	EEM <sup>2</sup>
<b>Consumo g día<sup>-1</sup></b>						
MS	818	818	818	818	818	
MO	779	778	778	779	779	
ALM	451	455	437.8	456.2	453	
N	13.9	14.1	14.1	14.0	13.9	
FND	124.6	115.4	114.2	115.2	112.4	
EB	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
<b>*Flujo duodenal g día<sup>-1</sup></b>						
MO <sup>3,4</sup>	448.8	382	379.8	327	383	91.2
ALM <sup>3,5,6,7</sup>	148.4	71.6	109.8	86.0	106.6	4.1
N <sup>8,9,10</sup>	15.1	15.0	13.0	11.8	12.6	1.3
FND	53.5	51.8	40.9	42.5	44.0	25.7
NM	8.8	9.1	8.2	7.7	8.0	1.2
MOFR <sup>3,4</sup>	419.2	488.0	481.2	529.6	476.6	69.4
<b>Excreción fecal g día<sup>-1</sup></b>						
MO <sup>8</sup>	168.6	163.4	143.7	153.3	12.7	
ALM <sup>10</sup>	16.1	4.7	4.2	6.7	13.2	5.8
N	5.7	5.5	5.4	4.9	4.9	0.1
FND <sup>6</sup>	64.8	73.3	62.9	66.3	63.4	4.1
EB <sup>6</sup>	1.028	1.034	0.896	0.958	0.958	0.004
<b>Digestión ruminal %</b>						
MO <sup>3,4</sup>	42.42	50.94	51.04	57.78	51.06	1.42
ALM <sup>3,5,6,11</sup>	66.86	84.34	74.58	80.94	76.74	1.88
FND <sup>9</sup>	59.98	54.58	63.46	62.98	61.26	2.12
Eficiencia microbiana <sup>8,12</sup>	21.05	18.81	17.47	14.77	16.74	7.63
EP <sup>8,9,13,14,15</sup>	1.02	1.01	0.86	0.78	0.85	0.008
<b>Digestión posruminal, %</b>						
MO <sup>4,8,16</sup>	67.78	61.08	64.72	60.56	65.18	6.47
ALM <sup>10,17</sup>	90.27	93.33	96.06	91.89	86.54	2.89
N <sup>16</sup>	60.09	62.28	57.86	53.37	60.92	2.52
<b>Digestión total, %</b>						
MO <sup>8</sup>	78.18	78.82	81.52	80.69	80.37	2.44
ALM <sup>10</sup>	96.15	98.96	99.02	98.42	97.15	3.48
N	58.56	60.70	61.23	60.92	64.49	7.16
FND <sup>4,6</sup>	48.18	34.87	44.43	42.56	43.56	2.89
ED, Mcalkg <sup>-1</sup> <sup>8,9</sup>	3.02	3.034	3.182	3.14	3.136	0.003
ED, % <sup>6</sup>	74.52	74.37	78.00	76.59	76.66	2.93

<sup>1</sup>E = sorgo entero, GO = Sorgo germinado 0 días y ensilado, G1 = Sorgo germinado 1 día y ensilado, G3 = Sorgo germinado 3 días y ensilado, G5 = Sorgo germinado 5 días y ensilado.

<sup>2</sup>EEM = Error estándar de la media.

<sup>3</sup>E vs G1, G3, G5 (P < 0.01).

<sup>4</sup>E vs GO (P < 0.05).

<sup>5</sup>E vs GO (P < 0.01).

<sup>6</sup>GO vs G1, G3, G5 (P < 0.10).

<sup>7</sup>Efecto cúbico germinado (P < 0.10).

<sup>8</sup>E vs G1, G3, G5 (P < 0.05).

<sup>9</sup>GO vs G1, G3, G5 (P < 0.05).

<sup>10</sup>Efecto lineal germinado (P < 0.05).

<sup>11</sup>Efecto cúbico germinado (P < 0.05).

<sup>12</sup>EM = g N microbiano kg<sup>-1</sup> de MO fermentada en rumen

<sup>13</sup>E vs G1, G3, G5 (P < 0.1).

<sup>14</sup>Efecto cuadrático germinado (P < 0.05).

<sup>15</sup>flujo de N no amoniacal al intestino delgado/Consumo de N.

<sup>16</sup>Efecto cúbico germinado (P < 0.1).

<sup>17</sup>Efecto cuadrático (P < 0.10).

\* (Galyean, 1997).

El efecto de los tratamientos sobre las características de digestión se muestran el cuadro 11 en donde se observa que: los tratamientos G1, G3 y G5 presentaron mayor digestión ruminal de la materia orgánica, DRMO [P < 0.01, 25.6 %; efecto cuadrático (P < 0.01) de germinado para G3], digestión ruminal del almidón, DRALM (P < 0.01, 25.6%; efecto cuadrático (P = 0.10) germinado para G3) y fibra detergente neutro DRFDN (P = 0.17, 4.31%) pero menor eficiencia proteica (P < 0.05, 18.65%) y digestión posruminal de la materia orgánica DPRMO (P < 0.05, 9.88%) respecto a E.

El tratamiento G0 presentó mayor DRMO (P < 0.05, 20 %), DRALM (P < 0.01, 26.14%), pero menor EM (P < 0.05, 13.20%) y DPRMO (P < 0.05, 9.88%) respecto a E. El proceso de germinado, disminuyó la DRALM y EP, G0 presentó el mayor valor de DRALM (efecto cúbico, P < 0.05) y EP (efecto cuadrático, P < 0.05). G1, G3 y G5 presentaron mayor DRFND (P < 0.05, 14.63%), pero menor DRALM (P < 0.10, 5.20%) y eficiencia proteica EP (P < 0.05, 18.04%), respecto a G0.

La DPRALM fue mayor para G1 (P < 0.05, 9.91%) con respecto a G5. Los tratamientos G1, G3 y G5 mostraron mayor digestión total de la materia orgánica DTMO (P < 0.05, 3.42%), digestión total del almidón DTALM (P = 0.18, 2.12%) y digestión total del nitrógeno DTN (P < 0.10, 3.65%) respecto a E, y éste mayor DTMO (P = 0.11, 2.61%), DTFDN (P < 0.10, 24.79%) respecto a SG0E. La DTALM fue mayor (P = 0.13, 2.9%) para G0 y menor para DTFDN (P < 0.05, 27.62%) respecto a E. Se observa un efecto lineal para germinado en DTALM (P < 0.05) en donde al aumentar los días de germinado, disminuyó el porcentaje DTALM. La energía digestible ED (Mcal kg<sup>-1</sup>) fue mayor para G1, G3 y G5 (P < 0.05, 4.39%) respecto a E. Los valores de ED (Mcal kg<sup>-1</sup>) de los granos tratados, con la técnica de reemplazo fueron 3.79, 3.81, 4.01, 3.96 y 3.96 para E, G0, G1, G3 y G5 respectivamente.



**Cuadro 12. Influencia del grano de sorgo germinado y ensilado sobre el pH ruminal, concentración de AGV's y producción de metano.**

	Tratamientos <sup>1</sup>					EEM <sup>2</sup>
	E	GO	G1	G3	G5	
pH Ruminal <sup>3,4,5</sup>	5.88	5.98	6.4	6.26	6	0.03
AGV totales mM mol/100mol	63	58.06	62.1	62.78	68.52	8.55
Acetato <sup>6,7,8</sup>	63.78	57.42	63.84	66.94	64.84	3.69
Propionato <sup>9,10</sup>	20.96	28.4	23.04	19.16	20.02	1.45
Butirato	15.24	14.18	13.16	13.92	15.16	0.09
Actetato/propionato <sup>7</sup>	3.094	2.106	2.842	3.806	3.382	0.42
Producción metano <sup>11,12, 13, 14</sup>	0.60	0.51	0.58	0.63	0.60	0.01

<sup>1</sup>E = Sorgo entero, GOE = Sorgo germinado 0 días y ensilado , G1E = Sorgo germinado 1 día y ensilado, G3E = Sorgo germinado 3 días y ensilado, G5E = Sorgo germinado 5 días y ensilado

<sup>2</sup> EEM = Error estándar de la media

<sup>3</sup>E vs G1 G3 G5 P < 0.05

<sup>4</sup>G1 vs G5 P < 0.05

<sup>5</sup>Efecto cuadrático germinado, P < 0.05

<sup>6</sup>E vs G0 P < 0.05

<sup>7</sup>G0 vs G1 G3 G5 P < 0.05

<sup>8</sup>Efecto lineal germinado P < 0.01

<sup>9</sup>E vs G0 P < 0.1

<sup>10</sup>Efecto lineal germinado P < 0.1

<sup>11</sup>E vs G0 P < 0.05

<sup>12</sup>GO vs G1 G3 G5 P < 0.01

<sup>13</sup> Efecto lineal germinado P < 0.05

<sup>14</sup> Metano, mol mol<sup>-1</sup> de equivalente de glucosa fermentada en rumen

En el cuadro 12 se observan las características de fermentación ruminal de las dietas con sorgo germinado y ensilado. El pH ruminal fue mayor (P < 0.05, 5.78%) para G1, G3 y G5 respecto a E. En donde G1 presentó el mayor valor de pH (efecto cuadrático de germinado, P < 0.05). Al incrementarse los días de germinación aumenta la proporción molar de acetato (efecto lineal, P < 0.01) y disminuye propionato (efecto lineal, P < 0.01). La menor concentración de metano se observa en G0 (P < 0.01, 19.36%) respecto a G1, G3 y G5, ya que al incrementarse los días de germinado se incrementa la estimación de la producción de metano (efecto lineal, P < 0.05)

## 8. DISCUSIÓN

### Experimento 1: Prueba con hipoclorito de sodio

El crecimiento fungal en los alimentos destinados a la alimentación animal es un problema de las empresas pecuarias con un gran número de animales. Por ello, es importante tener un control sobre los alimentos, especialmente en los que tienen alto porcentaje de humedad (Milner, 1951) como el utilizado en este trabajo, o en alimentos hidropónicos. De acuerdo con Williams y Rao (1981); Compton (1990), la semilla de sorgo llega a ser infectada hasta por 40 géneros de hongos, que incluyen a los que inciden desde la floración hasta los desarrollados después de la madurez. En un proceso de germinación se puede reducir en buena medida la contaminación por hongos, si la semilla es tratada con un inhibidor fungal efectivo, que no afecte su germinación, crecimiento y principalmente, que no sea tóxico para los animales.

Una buena práctica para la desinfección en alimentos como cereales, vegetales y frutas, es la aplicación de hipoclorito de sodio (Andrews, 1986; Frisvad *et al.*, 1986; Sauer y Burroughs, 1986; Christensen, 1991; Pitt *et al.*, 1992). Pitt *et al.*, (1992) reportan que concentraciones de 1-2 % NaClO por 1 a 2 minutos es un tiempo de exposición inadecuado para lograr una buena desinfección de la superficie del alimento. En contraposición, Andrews (1986), demostró en grano de sorgo que con 2 minutos de exposición al cloro al 0.35 % era suficiente para lograr una buena desinfección, pero no lo recomienda para semillas con gran contaminación fúngica cuyo género principal es *Aspergillus sp.* Por lo que es importante evaluar dependiendo de las condiciones que se tengan, el tiempo de exposición de semillas con alta carga fungal. En el presente estudio se observó que al incrementar la concentración de NaHClO de 0.6 a 0.84% disminuyó la germinación de las semillas. Existen otros factores que afectan la germinación como la temperatura y humedad tanto del sustrato como la ambiental (Helms *et al.*, 1997), la calidad fisiológica, sanitaria (contaminación fungal) y genética de la semilla (Finch-Savage, 1995), La semilla de sorgo puede germinar entre 4.5 y 16.5 °C, según su origen genético y la disponibilidad de humedad (Stickler *et al.*, 1962; Payne *et al.*, 2003), no obstante, la temperatura óptima para este proceso varía entre 26.5 y 37.7 °C (Brar, 1994). Sin embargo, en este trabajo se registró

un rango que fue de 10 a 32 °C, lo cual concuerda con los autores citados. Pese a que se obtuvo una temperatura óptima no se obtuvieron grandes porcentajes de germinación, lo que pudo ser influenciado por los factores anteriormente mencionados. Otro factor que se ha observado es que el tamaño de la semilla influye en la germinación y vigor de la plántula de algunos genotipos (Maranville y Clegg, 1977; Mortlock y Manderlip, 1989). Otro factor de controversia, es la frecuente ausencia de correlación entre los resultados de germinación y vigor obtenidos en laboratorio con aquellos de campo (Wanjari *et al.*, 1992). Según Moreira y Naka (1988), la disminución de vigor afecta la capacidad de germinación de una semilla en dos formas: reduce la velocidad de germinación y aumenta el porcentaje de plántulas anormales. Cabe mencionar que las semillas del presente estudio no fueron seleccionadas por sus características de vigor, sino por su disponibilidad para la alimentación animal.

### **Experimento 2: Digestión enzimática *in vitro* del almidón**

La digestibilidad ruminal *in vitro*, así como la determinación de la concentración de almidón total contenido en los cereales pueden ser usados como indicadores para la selección de granos empleados en la alimentación animal de acuerdo con Wester, *et al.*, (1992), quienes determinaron el porcentaje de almidón total de varios híbridos de sorgo y estimaron un rango que va de 64.3 a 70.3 % ( $P < 0.01$ ). Hibberd *et al.*, (1979a) demostraron que el almidón contenido en diferentes genotipos de sorgo fluctúa entre 66.6 y 79.5% ( $P < 0.01$ ), lo cual coincide con nuestro trabajo en donde el rango fue de 65 a 75 % ( $P > 0.05$ ) por lo que es posible aseverar que los tratamientos a los que fue sometido el grano de sorgo en este estudio no afectaron el contenido de almidón total en el grano, pero es posible que se vea afectado por el tipo de híbrido y genética del grano (Hibberd *et al.*, 1979a).

Rodríguez *et al.*, (2001) emplearon la técnica utilizada en este trabajo para determinar el almidón soluble (4 h) e insoluble (6 h). Sin embargo Salinas *et al.*, (1999) emplearon sorgo rolado y Zinn, (1991) empleó sorgo hojueado al vapor, en donde encontraron un porcentaje de AS de 9.1 para sorgo rolado, 17.5 y 28.3 en sorgo hojueado al vapor y el porcentaje de AI fue de 64.7 para sorgo rolado,

59.6 para y 53.7 en hojueado al vapor. El promedio obtenido en este estudio fue de 7.64 % para AS, por lo que es probable que el proceso de germinado y ensilado no impactara en esta fracción del almidón ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el proceso de germinado y ensilado modificó la fracción AI ya que el E, tuvo un 35 % vs 43.3% que fue el promedio registrado de todos los tratamientos de sorgo germinado y ensilado ( $P < 0.05$ )

En cuanto a la predicción de la digestibilidad ruminal *in vitro*, los trabajos realizados por Zinn, (1991) y Salinas *et al.*, (1999) reportan valores de 72.1 % con sorgo rolado y un 78.5 y 87.3% para sorgo hojueado al vapor. Dichos valores son mayores con respecto a los obtenidos para los tratamientos empleados en este experimento, dado que para E se obtuvo 61 % de DRIV y el mayor valor de 69 % para G4 con 42 días de ensilaje. Por lo que la DRIV de E fue menor 18 %, respecto a los tratamientos 21-3, 21-5, 42-0, y 42-1 días de ensilaje-germinado respectivamente. Las diferencia en los valores de digestibilidad, con lo valores reportados, puede ser explicada por: 1) la existencia de diversas variedades de grano sorgo que pueden afectar las propiedades y valor alimenticio de éste cuando es procesado. Esta variación considerable se ha visto en diferentes métodos de procesamiento del grano como por ejemplo, micronizado, hojueado al vapor y reventado (Rooney *et al.*, 1980; Rusnak *et al.*, 1980). 2) las condiciones ambientales prevalecientes durante la maduración del sorgo determina la digestibilidad del mismo (Rooney y Plugfelder, 1986). Y 3) el reportado por Osman *et al.*, (1970) quienes demostraron que la interacción de calor, presión y humedad hacen más susceptible al almidón del grano a la degradación enzimática *in vitro* .

Hernández *et al.* (2007) midieron la DRIV con la misma técnica empleada en este estudio y obtuvieron en sorgo reconstituido y ensilado a 0, 21 y 42 días en promedio un % de DRIV de 64.36, 62.45 y 67.11, respectivamente. Para el sorgo quebrado y ensilado con los mismos días un porcentaje de DRIV promedio de 61.00, 67.46 y 66.43 respectivamente. Éstos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación en donde el promedio de DRIV a los 21 días de ensilaje fue de 66.5 %, 42 días de ensilaje fue de 66.75 % y a los 63 días de ensilaje fue de 65.25 %.

### **Experimento 3: Prueba de digestibilidad *in vivo***

Los valores de media geométrica del tamaño de partícula (MGTP), desviación estándar geométrica (DEG), partículas por gramo (PG) y área de superficie (SA) encontrados coinciden con lo reportado por Villarreal (2007) donde el promedio de MGTP fue de 3,179  $\mu\text{m}$ , para nueve variedades de sorgo. Por lo que el proceso de germinado no afectó el tamaño de partícula.

Está bien documentado, que los resultados de pruebas de digestibilidad del almidón con diferentes granos procesados (maíz, trigo y sorgo) realizadas en su mayoría en bovinos, resulta difícil compararlos. Esto se debe a que existen diferentes factores que modifican la digestión del almidón, entre ellos la composición y las características físicas del almidón, la interacción proteína - almidón, los factores antinutricionales (Ronney y Pflugfelder 1986), fuente de almidón, tipo y grado de procesamiento (Thorne *et al.*, 1983); tipo y nivel de forraje, nivel de consumo, edad del animal (Mendoza y Ricalde, 1993a), y especie animal (Aerts *et al.*, 1984; Owens, *et al.*, 1997). En este sentido Jordan y Staples (1951) mencionan que los bovinos tienden a digerir mejor los alimentos groseros como el forraje mientras que los ovinos digieren mejor los alimentos concentrados. Se ha sugerido, que esto se debe al menor tamaño del orificio retículo-omasal del ganado ovino que permite una retención más eficiente del grano en el rumen, hasta ser reducido durante la rumia a un tamaño suficiente para abandonar el rumen, atravesando el mencionado orificio. En tanto el vacuno, dado el mayor diámetro del orificio retículo-omasal que permite la salida del grano íntegro. Esta característica se ha utilizado para incluir el grano entero (en este caso utilizando maíz) en la alimentación del ganado ovino, sin detrimento de su digestión, esta aseveración es apoyada por Beretta *et al.*, 2004 que sugieren que la digestibilidad del almidón de cereales (principalmente sorgo y maíz) en ovinos se acerca al 100%, por lo que es limitada la posibilidad de mejora en la digestión por procesamiento de los granos de acuerdo con Ørskov y Fraser (1975) quienes emplearon cebada. Sin embargo, lo anterior se contrapone a lo indicado por Bowen *et al.* (2007) quienes encontraron concentraciones de almidón en heces de ovinos alimentados *ad libitum*, con dietas basadas en sorgo entero de 240 a 310 g

kg<sup>-1</sup> MS y al ofrecer sorgo expandido se redujo ( $P < 0.05$ ) la concentración de almidón fecal a 76 g kg<sup>-1</sup> MS. Estos resultados indican que si hay diferencias en la utilización del almidón debida al tipo de procesamiento en dietas para ovinos.

En el presente estudio se obtuvo una excreción fecal de almidón de 19.70 g kg<sup>-1</sup> MS para E, mientras que para G0 5.83 g kg<sup>-1</sup> MS, SG1E 5.20 g kg<sup>-1</sup> MS, G3 8.26 g kg<sup>-1</sup> MS y G5 16.20 g kg<sup>-1</sup> MS. Orozco *et al.*, (2010) encontraron en una prueba de comportamiento con ovinos en donde el consumo fue *ad libitum*, una concentración de almidón fecal de 114 y 178 g kg<sup>-1</sup> MS para sorgo quebrado y sorgo entero respectivamente, por lo que el nivel de consumo es un factor determinante en la digestión del almidón. Mendoza *et al.*, (1999) reportan valores de digestión del almidón de grano de sorgo de 99 % en ovinos con consumo restringido. Por lo anterior, es probable que cuando el ovino tiene un consumo restringido, aproveche mejor el almidón del grano entero.

La retención del grano de sorgo en el rumen (Zinn, 1993; 1994) hasta su fragmentación es especialmente importante, por la elevada resistencia del pericarpio a la degradación ruminal (Guada, 1993). También se ha observado que hay diferencias en la intensidad y la velocidad de la degradación ruminal del almidón, tanto dentro, como entre granos y se han registrado ventajas del procesamiento de aquellos granos con menor degradación, como son el sorgo y el maíz.

Entre los procesos más estudiados para controlar la tasa y grado de la utilización en el rumen del almidón están: el manejo del consumo de alimento, procesamiento de los granos y más recientemente el uso de aditivos alimenticios. A continuación se presenta un cuadro comparativo de valores de digestibilidad ruminal y en el tracto total del almidón de grano de sorgo en diferentes estudios realizados en ovinos:

**Cuadro 13. Resumen de digestibilidad total y ruminal del almidón en ovinos**

Referencia	Tratamiento del grano de sorgo	% grano en la dieta	Consumo	% de digestibilidad		
				Tracto total	Ruminal	
Buchanan-Smith <i>et al.</i> (1968)	Grano molido	78.26	<i>ad libitum</i>	92.8		
	Reconstituido	78.26		93.0		
	Hojueleado al vapor	78.26		93.7		
Holmes <i>et al.</i> (1970)	Rolado al vapor	80	<i>ad libitum</i>	97.0	89.0	
	Presión con vapor y rolado	80		96.0	84.0	
Rangél <i>et al.</i> (2006)	Entero	70		94.8		
Mendoza <i>et al.</i> (1999)	Rolado en seco	100	restringido	98.2	51.3	
		67		99.0	70.2	
Rojo <i>et al.</i> (2005)	Entero	70	restringido	95.0	62.1	
				93.8	83.0	
Mora <i>et al.</i> (2002)	Entero	50	<i>ad libitum</i>	98.2	75.1	
García (2010) presente estudio	Entero	72	restringido	96.1	67.0	
				GO	98.9	84.0
				G1	99.0	74.5
				G3	98.4	80.94
				G5	97.0	76.7

En cuanto a la digestión ruminal y del tracto total de la MO, Mora *et al.* (2002) alimentando ovinos con una dieta con 50 % de sorgo molido, obtuvieron una digestión de la MO de 51.81 % y 76.02 % en rumen y el tracto total respectivamente. Por su parte Rojo *et al.* (2005) reportan, con una dieta con 70 % de sorgo molido, una digestión ruminal de MO 43.6 % y 70.7 % en la digestión total. Lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio (42.42 y 57.78 %, para sorgo entero y G3 respectivamente). El promedio de digestión de MO para los sorgos germinados (G1, G2 y G3) fue de 53.29 y 80.86% para digestión ruminal y del tracto total respectivamente. Lo cuales fueron superiores en 25.6 y 3.5 % respecto a E, lo cual indica que el proceso de germinado y ensilado mejoró

la digestión de MO. Buchanan *et al.*, (1968) reportan una digestibilidad total de la MO en sorgo reconstituido y rolado de 83 %, para grano molido 82 % y en hojueleado al vapor 83 %, los cuales son similares a los encontrados en este trabajo, donde se registró 78 % para E y G0, mientras que para G1, G3 y G5 la digestibilidad total de la MO fue en promedio de 80.9 %. Esta mayor digestión total de MO para los granos germinados, se debió a un incremento de la digestión ruminal. La mayor digestión ruminal del almidón, para el grano reconstituido y para los granos germinados respecto a sorgo entero, se debe a que el tiempo de germinado influye en la actividad de las enzimas proteolíticas endógenas (Balogun *et al.*, 2006), lo que permite que el almidón y los péptidos resultantes de la proteólisis estén disponibles para las bacterias en el rumen. Sin embargo al aumentar los días de germinado disminuye (efecto lineal de germinado,  $P < 0.05$ ) la digestión de almidón, debido a una disminución de la digestión posruminal del almidón (efecto lineal de germinado,  $P < 0.05$ ). Esto se puede deber a que durante el proceso de germinación las fracciones de las proteínas de reserva se transforman en pequeños péptidos y aminoácidos (principalmente), estos pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas o para proporcionar energía, y la utilización de almidón para el crecimiento de la plántula (Barceló *et al.*, 2000). Holmes *et al.*, (1970) han reportado que cuando el grano de sorgo es tratado con vapor presenta una DRALM de 89 %, mientras que en sorgo entero se ha reportado un máximo de 75 %. En el presente estudio se obtuvo para E 67% y 84 % para G0. La DRALM para sorgo entero concuerda con lo reportado con Rangél *et al.*, (2006) y Rojo *et al.*, (2005).

En cuanto a DTALM los valores obtenidos en este trabajo (rango de 96 a 99 %), concuerdan con Mendoza *et al.*, (1999) y con Mora *et al.*, (2002) quienes trabajaron con ovinos con consumo restringido obteniendo valores de 99 y 98.24 %, respectivamente. Sin embargo, estas cifras son superiores a lo reportado por Buchanan-Smith *et al.*, (1968) con sorgo reconstituido, 93.0 %, y con Rojo *et al.*, (2005) 94.8 %, quienes alimentaron ovinos *ad libitum*. Así, el nivel de consumo es uno de los principales factores que influyen en la digestión del almidón en ovinos. En la digestión total de FND, Mora *et al.*, (2002) reportaron 48.09 % para sorgo molido, lo cual concuerda con el valor para sorgo entero en el presente estudio



(48.18 %), sin embargo los valores para sorgo reconstituido y germinado (rango de 34.87 a 44.43%) son menores respecto a sorgo entero, lo cual puede deberse a la presencia de almidón soluble y esto disminuye la digestión de la fibra (Owens y Zinn, 2005).

Al incrementarse los días de germinado (efecto lineal,  $P < 0.10$ ), se incrementó la digestión posruminal de N, debido al desdoblamiento de la matriz proteica del grano y permitió mayor disponibilidad de N a ese nivel. Los valores de digestión total de N para E es de 59 %, y en los tratamientos un máximo de 65 % para G5 y un mínimo de 61 % para G0, G1 y G3. Los cuales están por debajo de lo reportado por Buchanan *et al.*, (1968), quienes observaron una digestibilidad total del N de 73.2 % con sorgo reconstituido y rolado, 72 % con grano molido y 69 % con hojueado al vapor. Los valores de eficiencia microbiana (g N microbiano  $\text{kg}^{-1}$  de MO fermentada en rumen) que estuvieron en un rango de 14.8 a 21, concuerdan con los valores reportados por Abreu *et al.*, (2004) de 10.9 a 17.6 en ovinos de pelo y son superiores a los reportados por Salisbury *et al.*, (2004) de 10.2 a 11.7 con dietas basadas en forraje. Los tratamientos con sorgo germinado y ensilado presentaron menor eficiencia microbiana respecto a sorgo entero, lo cual no concuerda con la mayor digestión de MO y almidón en los germinados. Desafortunadamente se tuvo problemas con la estimación de la digestión de N en rumen (datos no presentados), para saber si la disponibilidad de N fue una limitante, debido a que el crecimiento microbiano depende en gran medida en la cantidad de almidón y nitrógeno fermentados a nivel ruminal (Rusell, 1981).

Buchanan *et al.*, (1968) encontraron una digestibilidad total de la ED de 81 % con sorgo reconstituido y rolado, 80 % para grano molido y rolado al vapor, los cuales son similares a los encontrados en este trabajo, donde el porcentaje de ED fue de 74 para E y G0 y 77 para G1, G3 y G5. Respecto a los valores de ED ( $\text{Mcal kg}^{-1}$ ) obtenidos por la técnica de reemplazo, G1 obtuvo el mayor valor (4.01) el cual fue superior en 5.8 % a E (3.79), 5.2% a GO (3.81), 1.3% a G3 (3.96) y G5 (3.96). El mayor valor energético para G1 concuerda con el tratamiento que presentó la mayor digestión de MO, almidón y N.

El promedio de pH ruminal de 6.1, encontrado en el presente estudio, concuerda con lo reportado por Mendoza *et al.* (1999) de 6.2 en ovinos con una dieta con 75 % de sorgo rolado en seco y con Rojo *et al.*, (2005) de 6.15 utilizando en ovinos una dieta a base de 75 % de grano de sorgo molido. El mayor valor de pH encontrado en los tratamientos germinados (6.22), se pudo deber al mayor contenido de fibra como lo señala Chung *et al.* (1989), quien encontró que el contenido de fibra se incrementa en cebada germinada de 3.75 a 6 % en 5 días de germinado. En la concentración total de AGV's, la concentración total observada en el presente trabajo (62.9 mM) concuerda con Rojo *et al.* (2005) (59.91 - 68.71). Sin embargo, se encuentran por debajo de lo reportado por Mendoza *et al.*, (1999), Mora *et al.* (2002), y Rangel *et al.* (2006) de 102.3, 94.74 y 83, respectivamente). Sin embargo, los tratamientos de sorgo no modificaron la concentración total de AGV's. lo que está en desacuerdo con lo reportado por Balogun *et al.*, (2005) quienes encontraron en una prueba *in vitro*, que la germinación de grano de sorgo por 5 días aumentó la producción total de AGV's, comparados con sorgo rolado seco y sorgo remojado por 24 horas en 98.5 y 168 % respectivamente.

Respecto a la proporción molar de acetato, propionato y butirato, los cuales fueron en promedio de 63, 22 y 14, los valores de acetato se encuentran ligeramente por arriba de lo reportado por Rangel *et al.*, (2006) de 58 y por debajo de lo reportado por Mendoza *et al.*, (2009) de 53. En cuanto a propionato, su valor estuvo por abajo a lo reportado por Mendoza *et al.*, (1999), Rojo *et al.*, (2005) y Mora *et al.*, (2002) que en promedio reportan 30 % y la concentración de butirato concuerda con Rojo *et al.* (2005) de 12 – 16% y con Mora *et al.*, (2002) de 13 % y es mayor a lo reportado por Mendoza *et al.*, (1999) de 11 % y Rangél *et al.*, (2006) de 9 %. En el tratamiento G0, se incrementó la proporción molar de propionato y disminuyó la de acetato, respecto a entero y los germinados. Lo cual concuerda con la mayor digestión de almidón ruminal para este tratamiento. Por lo que es posible, que el proceso de germinación incrementó la proporción de acetato, a expensas de propionato.

En cuanto a la producción estimada de metano, el tratamiento G0 fue menor 18 %, respecto a E y germinados, lo cual se debió a la mayor producción de propionato. Al incrementarse los días de germinado, se incrementa la producción de metano (efecto lineal,  $P < 0.05$ ). Sin embargo, los valores son similares a sorgo entero.

## 9. CONCLUSIONES

### Experimento 1

- Al incrementarse la concentración de hipoclorito de sodio (0.6 y 8.84 %) y el tiempo de exposición (16 y 24 hrs) se reduce la contaminación fungal, pero también se reduce el porcentaje de germinación de la semilla (excepto 16 hrs).
- El tratamiento más conveniente en cuanto a germinación y presencia de hongos utilizado en el estudio, fue 0.6% de hipoclorito de sodio por 24 h, con 48 % de germinación y 3.7 % de hongos

### Experimento 2

- El proceso de germinación y ensilaje, incrementó la digestión *in vitro* del almidón del grano de sorgo, debido a una mayor disponibilidad de su fracción insoluble.

### Experimento 3

- El proceso de germinación y ensilaje incrementó la digestión total de materia orgánica, almidón y valor energético respecto a sorgo entero.
- El proceso de germinación y ensilaje, incrementó pH ruminal y la proporción molar de acetato a expensas de propionato respecto al grano de sorgo entero, debido a un incremento de la digestión ruminal.
- La producción estimada de metano fue menor para el tratamiento SG0E.
- Al aumentar los días de germinado, disminuye la digestión del almidón y energía digestible, por lo que el mejor tratamiento en términos de mayor digestión de almidón, pH ruminal y valor energético fue para G1.

## 10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Aerts JV, De Brabander DL, Cottyn B.G, Boucque ChV, Buysse FX. Comparative digestibility of feedstuffs by sheep and cows. *Anim Feed Sci and Technol* 1984; 12:47-56.

Andrews S. Optimisation of conditions for the surface disinfection of sorghum and sultanas using sodium hypochlorite solutions. In: King AD, Pitt JI Beuchat LR, Cony JE (editors). *Methods for the Mycological Examination of Food*, Plenum Press, 1986.

AOAC, Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. In: Helrich, editor *Method 984.13*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA 1990.

Azcón BJ, Talón M. *Fisiología y Bioquímica vegetal*. España: McGraw-Hill, 1993.

Baker S, Hermann TL. Evaluating particle size. *Feed manufacturing*. Publ.MF-2051. Dept. Grain Sci. and Ind., Kansas State Univ., Manhattan, KS, 2002.

Balogun R, Bird S, Rowe JB, Thompson RD. Improving the nutritive value sorghum grain by germination. *J Anim Sci* 2000; B:160

Balogun R, Bird SH, Rowe JB. 2005. Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim Feed Sci and Technol* 2005;120: 141-150.

Balogun R, Bird SH, Rowe JB. Germination temperature time affect in vitro fermentability of sorgum grain. *Anim Feed Sci.and Technol* 2006; 127:125-132.

Barceló CJ, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R. *Fisiología vegetal*. España: Pirámide, 2000.

Bavera GA. *Procesamiento del sorgo para engorde bovino*. 2001. (Citado en octubre 2010). Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>

Bergen WG, Purser DB, Cline JH. Protein effect of ration on the nutritive quality of rumen microbial. *J Anim Sci* 1968; 27:1497-1501.

Beretta V, Simeone A, Thompson JM, Rowe JB. Grain feeding for increasing value of cast-for-age Merino Sheep. *Anim Prod Aust* 2004; 25.

Blas C, Rebollar, PG, Méndez J. Utilización de cereales en dietas de vacuno lechero. XI CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA; 1995 noviembre 7-8; Barcelona España.

Bowen MK, Pepper PM, Winkleman J, McConnel I. Concentrates based on sorghum grain provide a basis for a finishing system for crossbred lambs. *Aust J Exp Agri* 2007; 47 (11):1317-1325.

Brar GS, Stewart BA. Germination under controlled temperature and field emergence of 13 sorghum cultivars. *Crop Sci* 1994; 34:1336-1340.

Brent TC. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J Anim Sci* 1986; 63: 1649-1662

Buchanan SJ, Robei T, Tillman AD. Effect of methods of processing on digestibility and utilization of grain sorghum by cattle and sheep. *J Anim Sci* 1968; 27:525.

Cañeque MV, Sancha SJL. *Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes*. España: Mundi Prensa, 1998.

Chai W, Uden P. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Anim Feed Sci Technol* 1998; 74:281–288.

Chung T, Nwokolo EN, Sim JS. Compositional and digestibility changes in sprouted barley and canola seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 1989; 39: 267-278.

Church DC. *Fisiología digestiva del rumiante*. México: Acribia, 1993.

Cisneros ME. Híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío. Calidad de las semillas y su influencia en el establecimiento de plántulas. *Agrociencia* 2007; 41:45-55.

Compton LP. *Agronomía del sorgo. Programa de mejoramiento*. ICRISAT para América Latina 1990; 30-34.

Corona GL, Zinn RA. Influence of corn vitreousness and processing of site and extent of digestion by feedlot cattle. *J Anim Sci* 2005; 83(1):48.

Christensen CM. Fungi and seed quality. In: D.K. Arora et al. (editors), *Handbook of Applied Mycology, Vol. 3, Foods and Feeds*, Marcel Dekker, New York 1991; 99-120.

Curá JA, Krisman CR. Cereal grains: a study of their  $\alpha$ -1,4 -  $\alpha$ -1,6 glucopolysachharide composition. *Starch/Stärke* 1990; 5:171-175.

Earpa CF, McDonoughb CM, Rooney LW. Microscopy of pericarp development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Cereal Sci* 2004; 39:21–27.

Finch-Savage WE. 1995. Influence of seed quality on crop establishment, growth and yield. In: Basra, A. S. (ed). Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications. Food Products Press. N. Y. pp 361-384.

Frisvad, J.C., Kristensen, A.B, Filtenborg O. Comparison of methods used for surface disinfection of food and feed commodities before mycological analysis. In: A.D. King et al. (editors), Methods for the mycological examination of food. New York: Plenum Press, 1986: 32-40.

Galyean ML. Laboratory procedures in animal nutrition research. Texas USA, 1997.

García B J. Proceso de germinación. 2003 (Citado en diciembre 2009). Disponible en:  
[http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema\\_17.htm#Factores%20internos](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm#Factores%20internos)

Glennie CW, Harris J, Liebenberg NV. Endosperm modification germinating sorghum grain. Cereal Chem 1983; 60(1):27-31.

Guada JA. 1993. Efectos del procesado sobre la degradabilidad ruminal de proteína y almidón. IX CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEEDNA. 1993 noviembre 8-9; Barcelona España.

Hale WH, Theurer BC. In D. C. Church (Ed.) Digestive physiology and nutrition of ruminants. Oregon State Univ Corvallis, 1972; Vol. 3.

Hale WH. Influence of Processing on the utilization of grains (Starch) by ruminants. J Anim Sci 1973; 37:1075-1080.

Helms TC, Deckard EL, Gregoire PA. Corn, sunflower and soybean emergence influenced by soil temperature and soil water content. J Agron 1997; 89:59-63.

Hernández, G. E. Efecto del nivel de humedad, tamaño de partícula y tiempo de almacenaje sobre la digestión *in vitro* del almidón y características de fermentación de sorgo grano (*Sorghum bicolor* L. Moench) reconstituido y ensilado. (tesis de licenciatura). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2007.

Hibberd CA, Mitchell ED, Wagner DG, Hintz RL. Seed characteristics of different varieties of grain sorghum. Anim Sci Res Rep.Oklahoma Agric Exp Sta, 1979a MP-104: 16.

Hibberd CA, Wagner DG, Hintz RL, Griffin DD. Effect of sorghum grain variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. J Anim Sci 1986; 61:702.

Hill FW, Anderson DL. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. J Nutr 1986: 64:587.

Holmes JH, Drennan MJ, Garrett NW. Digestion of steam-processed milo by ruminants. *J Anim Sci* 1970; 31:409-413.

Hubbard JE, Hall HH, Earle FR. Composition of the component parts of the sorghum kernel. *Cereal Chem* 1950; 27:415-420.

Huchet VD, Thuault, Bourgeois CM. Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. *Lait* 1995 ; 75:585-593.

Huntington GB. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *J Anim Sci* 1997; 75:825-867.

Ibar AL. Sorgo cultivo y aprovechamiento. México: Aedos, 1984

Jordan RM, Staples GE. Digestibility comparisons between steers and lambs fed prairie hays of different quality. *J Anim Sci* 1951; 10:236-243.

Kleter G, Lammers WL, Vos AE. The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese 1. Experiments in whey. *Neth Milk Dairy J* 1982; 36:79-87.

Kotarski SF, Waniska RD, Thurn KK. Starch hydrolysis by the ruminant microflora. *J Nutr* 1992; 122: 178-190.

Maranville JW, Clegg MD. Influence of soil bulk density on seedling emergence and vigor. *Crop Sci* 1997; 2:176-177.

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 1994; 72:3004-30018.

Mckee T, Mckee JR. Bioquímica, la base molecular de la vida. 3ª ed. España: MC Graw-Hill Interamericana, 2003.

Mendoza MG, Ricalde VR. Alimentación de ganado bovino con dietas altas en granos. Libro de texto. Distrito Federal: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, 1993a.

Mendoza GD, Britton RA, Stock RA. Effect of feeding mixtures of high moisture corn and dry-rolled grain sorghum on ruminal fermentation and starch digestion. *Small Rum Res* 1999; 32:113 -118.

Milner M. Biological factors in damp grain deterioration. *Food Technol* 1951; 5:25.

Mora JG, Bárcena GJ, Mendoza MG, González MS, Herrera HJ. Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas. *Agrociencia* 2002; 36:31-92.



Moreira CN, Nakagawa J. Semillas. Ciencia y tecnología de producción. Varela, R. (trad). Uruguay:Hemisferio Sur Montevideo, 1988.

Mortlock MY, Vanderlip RL. Germination and establishment of pearl and sorghum of different seed qualities under controlled high temperature environments. *Field Crops Res* 1989; 22:195-209.

Nordin MY, Campling RC. Digestibility studies with cows given whole and rolled cereal grains. *Anim Prod* 1976: 23:305-315.

Nutrient Requirements of Sheep. Sixth revised edition. National Academy Press. Washington, D. C., 1985.

Orozco HP. Efecto de grano de sorgo reconstituido y ensilado en el comportamiento productivo y características de la canal en corderos. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2010.

Orskov ER, Fraser C. The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion and voluntary intake of dried grass in sheep. *Anim Prod* 1975 ; 34, 493.

Osman HF, Theurer B, Hale WH, Mehen SM. Influence of grain processing on in vitro enzymatic starch digestion of barley and sorghum grain. *J Nutr* 1970; 100:1133.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *J Anim Sci* 1997; 75:868-879.

Owens FN, Zinn RA, Kim YK. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J Anim Sci* 1986; 63:1634-1648.

Owens FN, Zinn RA. Corn grain for cattle: Influence of processing on site and extent of digestion. 20th Annual Southwest Nutr. Conf., Phoenix, AZ. Univ. Arizona Tucson, 2005, 86–112 in Proc.

Pond WG, Church DC, Pond KR. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. 2ª ed. México: Limusa Wiley, 2004.

Payne WA, Balota M, Rosenow D. Sorghum diversity for germination and coleoptile elongation under cool conditions. *In: Proc. 23 rd Biennial Sorghum Ind. Conf* 2003, 14.

Pieroni GA. Utilización de grano de sorgo tratado con vapor en la suplementación de vacas lecheras en pastoreo. Tesis Magíster Scientiae. FCA UNMdP - EEA INTA Balcarce, Argentina, 2000.

Pitt JI, Hocking AD, Samson RA, King AD. Recommended methods for mycological examination of foods. In: R.A.Samson et al. (editors), *Modern Methods in Food Mycology*, Elsevier Science Amsterdam 1992, 365-368.

Ramírez VP, Ortega RP, López HA, Castillo GF, Livera MM, Rincón SF, Zavala GF (eds). Recursos filogenéticos de México para la alimentación y la agricultura, Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C., Chapingo, México; 2000. 130 p.

Rángel HA, Mendoza GD, Pinos JM, Bárcena R, Plata F, Ricalde R. Effect of exogenous Glucoamylase during Different periods of time on performance of lambs fed sorghum based diets. *J Appl Anim Res* 2006; 29:141-144.

Rodriguez S, Calderon JF, Zinn RA. Variation in ruminal starch digestion due to dry rolling *versus* steam flaking corn and sorghum can be reliably predicted based on changes in starch solubility and 6-h amylase reactive insoluble starch. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science*. 2001; Vol 52.

Rojas, GM. *Fisiología Vegetal*. 4ª Ed. México: McGraw Hill - Interamericana, 1993.

Rojo RR, Mendoza MG, Crosby GM. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad " *in vitro*" del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia* 2001; 35: 423-427.

Rojo R, Mendoza GD, González SS, Landois L, Bárcena R, Crosby MM. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim Feed Sci and Technol* 2005; 123–124:655–665.

Rubio RR, Mendoza MG, Crosby GM. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus Licheniformis* en la digestibilidad *in vitro* del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia* 2001; 35 (004):423-427.

Rooney LW. Utilization of sorghum grain: food and industrial. Grain sorghum research in Texas 1970. *Texas Agric Expt Stn Rept* 1971; 71-81.

Rooney LW, Khan MN, Earp CF. The technology of sorghum products. In G. Inglett (Ed.) *Recent Progress in Cereal Chemistry*: Academic Press, New York 1980.

Rooney LW, Pflugfelder RL. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J Anim Sci* 1986; 63:1607-1623.

Russell JR, Young AW, Jorgensen NA. Effect of dietary corn starch intake on pancreatic amylase and intestinal maltase and pH in cattle. *J Anim Sci* 1981; 52: 1177-1182.

Rusnak BA, Chou CL, Rooney LW. Effect of micronizing on sorghum varieties with different endosperm type. *J Food Sci* 1980; 45:1529.

Salinas J, Alvarez EG, Zinn RA. Influence of tempering on the feeding value of steam-flaked sorghum for feedlot cattle. Proc West Sect Am Soc Anim Sci 1999; 50: 325-330.

Salisbury M W, Krehbiel CR, Ross TT, Schultz CL, Melton LL. Effects of supplemental protein type on intake, nitrogen balance, and site, and extent of digestion in whiteface wethers consuming low-quality grass hay. J Anim Sci 2004; 82:3567-3576.

SAS: Users Guide Statistics. Version 9.00 para Windows. SAS Institute. Cary edition. USA. 2002

Sauer DB, Burroughs R. Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. Phytopathology 1986; 76:745-149.

Selahattin AB. The Relationship between Grain Yield and Waxy Endosperm in *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench. Tesis doctoral de Ankara University; M.S., Texas A&M University, 2004

Simpson JrEJ, Schake LM, Pflugfelder RL, Riggs JK. Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. J Anim Sci 1985; 60: 877–882.

Spicer LA, Theurer CB, Sowe J, Noon TH. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. J Anim Sci 1986; 62: 521.

Stefanie JW, Elferink O, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Deposito de documentos de la FAO. 1999. (Consultado en octubre, 2010). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486s/x8486s04.htm>

Stickler FC, Pauli AW, Casady AJ. Comparative responses of kaoliangs and other grain sorghum types to temperature. Crop Sci 1962; 2:136-139.

Stock RA, Sindt MH, Cleale RM, Britton RA.. High-moisture corn utilization in finishing cattle. J Anim Sci 1991; 69:1645-1656.

Stock RA, Brink DR, Britton RA, Goedeken FK, Sindt MH, Kreikemeier KK, *et al.* Feeding combinations of high moisture corn and dry-rolled grain sorghum to finishing steers. J Anim Sci 1987b; 65:290-302.

Streeter MN, Wagner DG, Hibberd CA, Owens FN. The effect of sorghum grain variety on site and extent of digestion in beef heifers. J Anim Sci 1990a; 68:1121-1132.

Sullins RD, Rooney LW. Microscopic evaluation of the digestibility of sorghum lines that differ in endosperm characteristics. Cereal Chem 1974; 51:134-142.

Sullins RD, Rooney LW. Light and scanning electron microscopic studies of waxy and nonwaxy endosperm sorghum varieties. *Cereal Chem* 1975; 52:361-366.

Taylor JR, Schussler L. The protein composition of the different anatomical parts of sorghum grain. *J Cereal Sci* 1986; 4:361-369.

Tejada de Hernández I. Control de Calidad y análisis de alimento para animales. Sistema de Educación continúa en Producción Animal. México; 1992.

Theurer CB. Grain Processing effects on starch utilization by ruminants. *J Anim Sci* 1986; 63: 1649-1662.

Thomas PC, Rook JA. En: *Recent developments in Ruminant Nutrition*. W. Haresign y D.J.A. Cole (eds). Butterworths, London 1981 pp: 157 .

Thorne MJ, Thompson LU, Jenkins DJ. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *Amer J Clin Nutr* 1983; 38:481.

Tonroy BR, Perry TW, Beeson WM. Dry, ensiled high-moisture, ensiled reconstituted high-moisture and volatile fatty acid treated high-moisture corn for growing-finishing beef cattle. *J Anim Sci* 1974; 39:931–936.

Villarreal SM. Relación entre la proporción de endospermo duro:blando y las características físico-químicas de 9 híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor L. Moench*) cultivados en el estado de Morelos. (Tesis de licenciatura). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2007.

Walker RD, Lichtenwalner RE. Effect of reconstitution on protein solubility and digestibility of waxy sorghum. *J Anim Sci* 1977; 44:843–849.

Wall JS, Blessin CW. Composition of sorghum plant and grain. In: Wall JS, Ross WM (eds). *Sorghum production and utilization*. AVI Publishing Co. W. Conn. Westport 1970, 702 pp.

Wanjari SS, Potdukhe NR, Dhope AM, Shekar VD, Patil DB. Effect of seed size on germination, field, emergence and vigor in some sorghum genotypes. *Agric Sci Digest* 1992; 12(2):59-61.

Wedad H, Abdelhaleem, Abdullahi H, El Tinay, Abdelmoneim I, Mustafa, Elfadil E. Effect of fermentation, Malt Pretreatment and cooking on antinutritional factors and protein digestibility of sorghum cultivars. *Pakistan J Nutrition* 2008; 7(2):335-341.

Wester TJ, Gramlich SM, Britton RA, Stock RA. Effect of grain sorghum hybrid on in vitro rate of starch disappearance and finishing performance of ruminants. *J Anim Sci* 1992; 70:2866-2876.

Williams RJ, Rao KN. A review of sorghum grain molds. *Trop. Pest Manage* 1981; 27:200-208.

Wolin MJ. A theoretical rumen fermentation balance. *J Dairy Sci* 1960; 43:1452-1459.

Wong JH, Tsang L, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel WH *et al.* Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J of Cereal Sci* 2009; 49:73–82.

Vos N. Über die Amin- und Ammoniakbildung im Gärfutter. D McPherso HT, Violante P. Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silages. *J Sci Food Agr* 1966; 17:124-127.

Xiong Y, Bartle SJ, Preston RL. Improve enzymatic method to measure processing effects and starch availability in sorghum grain. *J Anim Sci* 1990, 68:3861-3870.

Zinn RA, Owens FN. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can J Anim Sci* 1986; 66:157-164.

Zinn RA. Influence of Steaming time on site of digestion of flaked corn in steers. *J Anim Sci* 1990; 68: 776-781.

Zinn RA. Comparative feeding value of steam-flaked corn and sorghum in finishing diets supplemented with or without sodium bicarbonate. *J Anim Sci* 1991; 69:905-916.

Zinn RA. Influence of processing on the comparative feeding value of barley for feedlot cattle. *J Anim Sci* 1993; 71:3-10.

Zinn RA. Influence of flake thickness on the feeding value of steam-rolled wheat for feedlot cattle. *J Anim Sci* 1994; 72(1):21-28.

## ANEXOS 1

### 1. COLOCACIÓN DE CÁNULAS

#### **1.1 Manejo de animales**

##### **1.1.2 Manejo preoperatorio**

Entre los principios básicos de la cirugía, el período preoperatorio desempeña un papel importante, más aun cuando se trabaja con los órganos del tubo gastrointestinal y en ese caso el intestino delgado.

Una de las medidas más importantes que se tomaron durante el período preoperatorio fue el ayuno de 24 horas.

El cual permite prevenir que se produzcan vómitos que traigan como consecuencia la asfixia o la neumonía por la bronco aspiración. También evita que ocurran rupturas de vísceras durante el derribo del animal. Además, se facilita la localización y maniobras quirúrgicas sobre los diversos órganos de la cavidad abdominal y también se disminuye el riesgo de contaminación en las intervenciones de las vías digestivas.

##### **1.1.3 Inducción preanestésica**

Los animales se prepararon en las primeras horas del día. Se lavó perfectamente con agua y jabón de barra el área en donde se realizaría la cirugía, así mismo se rasuró la zona quirúrgica con el objetivo de eliminar el pelo alrededor del área para así evitar infecciones secundarias durante el proceso quirúrgico.

Para la inducción preanestésica se utilizó xilacina ( $10 \text{ mg kg}^{-1}\text{PV}$ ). La vía de administración fue intramuscular y el efecto tranquilizante y de relajación se manifestó en el animal después de 10 minutos.

##### **1.1.4 Intervención quirúrgica**

Después de la sedación se trasladó al animal hacia la mesa de operación, se colocó en decúbito lateral y se sujetaron las cuatro extremidades a la mesa en donde se realizó la cirugía. Después se desinfecto con yodo, el área rasurada y previamente lavada, enseguida se indujo a la anestesia disociativa con ketamina ( $3 \text{ mg kg}^{-1}\text{PV}$ ) la cual fue administrada vía intravenosa (yugular).

### **1.1.5 Momento quirúrgico**

Antes de comenzar la intervención quirúrgica se desinfectó el área de incisión con jabón quirúrgico y yodo y se colocaron campos quirúrgicos.

La cirugía se realizó de la siguiente manera:

### **1.2 Colocación de cánula ruminal**

Se realizó una incisión de 10 cm paralela al borde posterior de la última costilla y a 3 cm de la misma, se incide piel, tejido celular y músculo cutáneo.

Una vez que quedó expuesto el músculo oblicuo externo, se procedió a incidirlo, lo mismo se hizo con el oblicuo interno. La incisión se extiende por las fascias del músculo transverso abdominal y el peritoneo para poder exponer el saco dorsal del rumen. Se toma la pared ruminal con gasas, colocándolas en cada extremo de las comisuras de la herida con el objetivo de que no caigan líquidos dentro de la cavidad peritoneal al momento de incidir el rumen. Una vez incidido el rumen se colocó una cánula de Tygon y se sujetó con una jareta en la mucosa ruminal. Finalmente se fijó a la piel (Figura 10).



**Figura 10.** Ovino con cánula ruminal

### **1.3 Colocación de cánula simple en el duodeno proximal**

La fistulación duodenal o duodenostomía es la comunicación del duodeno con el exterior a través de un orificio que se ocluye con una cánula apropiada. Esta técnica ha sido utilizada con la finalidad de recolectar contenido duodenal.

La técnica operatoria consistió en la inserción duodenal de una cánula tipo T de Tygon aproximadamente 10 cm después de la desembocadura de los conductos pancreático y biliar. La ubicación de la fístula fue en la región abdominal a unos 5 cm de las costillas flotantes y paralelamente a ellas. Los períodos pre-operatorio y post-operatorio tuvieron una duración aproximada de 24 horas y siete días respectivamente.

La primera capa que se incidió con el bisturí fue la piel. Después, con la tijera, se fue abriendo el campo operatorio y se expusieron las fascias y capas musculares, que fueron rasgadas con los dedos para facilitar una mejor cicatrización. Cuando se observó el peritoneo, se introdujeron los separadores del campo operatorio y consecutivamente se tomaron con cuidado las asas intestinales.

En la cavidad abdominal se buscó con cuidado las asas del intestino delgado de la región duodenal, y después de encontradas, se buscó minuciosamente la región proximal al estómago (duodeno) teniendo como punto de referencia el páncreas. Al encontrar el lugar se retrocede unos 10 cm de la desembocadura del conducto pancreático y se fija el intestino con una pinza coprostática recta.

Con el intestino ya fijado por la pinza se incidió el asa intestinal para hacer la fístula y la inserción de la cánula. El corte del intestino se realizó con el bisturí. La longitud de la incisión fue de aproximadamente 3 a 4 cm.

Realizado lo anteriormente mencionado se realizó una jareta alrededor de la incisión en el asa intestinal con sutura de catgut. Terminada la sutura se introdujo la cánula en el interior del asa intestinal y finalmente fue fijada.

Posteriormente se fijó la cánula en la región abdominal a unos 4 cm de la última costilla flotante y paralelamente a ellas se realizó el orificio de salida de la fístula. La perforación de la zona fue ejecutada con mucho cuidado de no dañar el peritoneo de la región. Concluida la abertura del orificio se introdujo en el mismo una pinza Cosh curva con la que se fijó la cánula y se exteriorizó, después se le colocó un aro fijador, y tapón de plástico.

La etapa siguiente de la operación fue el cierre de la herida y se comienza con el peritoneo, donde se utiliza sutura de catgut. Antes de terminar la sutura de esta capa, en la cavidad se introdujo una solución con antibiótico (oxitetraciclina) para



neutralizar el desarrollo de agentes patógenos que pudieron penetrar durante el transcurso de la operación

#### **1.4 Manejo postoperatorio**

Terminada la intervención quirúrgica se trasladó al ovino a una jaula metabólica individual (1m<sup>2</sup>), durante siete días postoperación se le suministró 5 mL de antibiótico (penicilina con enrofloxacin) y por tres días 1.5 mL de analgésico antiinflamatorio (flumixin de meglumine) ambos por vía intramuscular. Enseguida de terminada la cirugía se les ofreció forraje y agua a los animales para su pronta recuperación. Lograda la recuperación total, el animal se preparó para la adaptación a la dieta y muestreo.

## ANEXO 2

### 2. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL LABORATORIO

#### 2.1 Cuantificación de ácido láctico por cromatografía de gases.

##### Determinación de ácido láctico en ensilados de grano de sorgo

- 1.- Pesar 50 g de ensilado y mezclar en 100 ml de agua destilada. Refrigerar a 4°C por 24 hrs.
- 2.- Colocar 2 capas de gasa y fibra de vidrio (pyrex) y filtrar la muestra refrigerada.
- 3.- Centrifugar en tubos de ensayo de 10mL a 3000 g por 30 minutos. Tomar 5 mL del sobrenadante.
- 4.- Adicionar 1ml de una solución de ácido metafosfórico : ácido fórmico al 25% en una proporción 3:1. Filtrar a través de un microporo con retención de 20 µm.
5. En un tubo vacutainer con tapón depositar 1 mL de filtrado y adicionar 2 mL de metanol y 0.4 mL de ácido sulfúrico al 50 %.
6. Cerrar el tubo perfectamente e incubar en baño maría a 55 °C por 30 min.
7. Adicionar 1 mL de agua y 0.5 mL de cloroformo, cerrar el tubo y mezclar evitando formar una emulsión.
8. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos con la finalidad de obtener 2 capas de líquido.
9. Con una jeringa (Hamilton) de 10 µL extraer 1 µL de líquido no acuoso e inyectar al cromatografo (Varian 3700).
10. Curva estándar. Preparar con una solución de ácido láctico al 1 % y se trata de la misma manera que la muestra a partir del punto 5. Se inyectan al cromatógrafo 1, 2, 3, 4 y 5 µL para obtener una curva estándar.
11. Condiciones de cromatógrafo:
  - temperatura columna 100°C
  - temperatura del detector de ionización de flama 200°C
  - temperatura del inyector 100°C
  - columna 90 °C temperatura inicial 5 minutos, posteriormente incrementa 27 °C por minuto hasta 120 °C
  - Flujos N<sub>2</sub> 30mL/min, H<sub>2</sub> 30mL/min, aire 300mL/min.
  - Columna acero inoxidable 6'x 118" chromosorb WDMCS 60/80 + 2% ácido fosfórico.
12. Cuantificar mediante regresión lineal.

## 2.2 Cuantificación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases

Este procedimiento es utilizado para cuantificar el contenido de ácidos grasos volátiles (AGV's) en líquido ruminal.

### Reactivos:

- 1.- Solución de ácido metafosfórico ( $\text{NaHPO}_3$ ) al 25 %: \*pesar 25 g de  $\text{NaHPO}_3$  y diluir en 1 L de agua destilada.
- 2.- Estándar: Se utilizó el estándar de Supelco TM WSFA-2 Mix (Catálogo No. 47056), con 1. Ácido Acético (C2:0), 2. Ácido Propiónico (C3:0), 3. Ácido Isobutírico (C4:0), 4. Ácido Butírico (C4:0), Ácido Isovalérico (C5:0) y 6. Ácido Valérico (C5:0).

### Procedimiento:

- 1.- Al final de cada periodo experimental, 4 h post consumo, coleccionar aproximadamente 100 mL de líquido ruminal mediante una bomba de vacío (Cole Parmer Instrument, Vernon Hill, IL.).
- 2.- Filtrar a través de 4 capas de gasa 40 mL de la muestra obtenida, adicionar 10 mL de  $\text{NaHPO}_3$  al 25 %. Depositarlo en bolsas de plástico, cerrar la bolsa, agitar rigurosamente y almacenar en congelación para su posterior centrifugación.
- 3.- Descongelar la muestra, tomar 25 mL y centrifugar a 17000 g por 20 minutos.
- 4.- Filtrar 5 mL del sobrenadante a través de un microporo con retención de 20  $\mu\text{m}$  y depositarlos en tubos de ensayo de 10 mL.
- 5.- Adicionar 15  $\mu\text{L}$  del marcador interno 3-ethyl-n-Valeric Acid (95% Sigma M-9252) a los 5 mL de líquido ruminal filtrado y mantener en refrigeración para su inyección en el cromatógrafo.
- 6.- Inyectar 2  $\mu\text{L}$  del estándar y de la muestra al cromatógrafo de gases.
- 7.- Condiciones del cromatógrafo de gases (Perkin Elmer auto system XL):
  - temperatura del detector de ionización de flama 250°C
  - temperatura del inyector 190°C
  - columna 80 °C temperatura inicial 1 min, posteriormente incrementa 15 °C por minuto hasta 200 °C

- Columna (Perkin Elmer elite wax), 30 m de longitud, 32 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  grosor de la fase estacionaria (df).
- Flujos  $\text{N}_2$  30mL/min,  $\text{H}_2$  30mL/min, aire 300mL/min

## **2.3 Determinación de nitrógeno amoniacal en contenido duodenal**

### **Procedimiento:**

- 1.- Moler las muestras de contenido duodenal a un tamaño de criba de 1mm de diámetro.
- 2.- Pesar 2 g de muestra, colocarlos en matraces de destilación.
- 3.- Adicionar 2 g de óxido de magnesio junto con la muestra en los tubos Tecator más 75 mL de agua.
- 4.- En matraces Erlenmeyer de 250mL, 100 mL de ácido bórico al 2.9%
- 5.- Destilar la muestra a 150 mL y recuperar el nitrógeno amoniacal en el ácido bórico 2.9%.
- 6.- Titular con ácido clorhídrico al 0.1N.
- 7.- La cuantificación se realiza de acuerdo a Galyean (1997).

## 2.4 Cuantificación de Almidón total

**Digestibilidad *in vitro* del almidón mediante la técnica descrita por Rodríguez *et al.*, 2001**

### **Reactivos:**

1. Solución de sulfato de zinc al 15% ( $ZnSO_4$  15%). Pesar en una balanza de precisión 150 g  $ZnSO_4$ , disolver en 1 litro de agua destilada.
2. Solución buffer: acetato de sodio anhidro 9.91g (16.44 si es la forma trihidrada) disolver en 7.27 ml de ácido acético glacial llevar a 1000 ml en agua destilada.
3. Solución enzimática: preparar diario. Pesar en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 0.55 mg de enzima amiloglucosidasa, de *Aspergillus niger*, (SIGMA A7420-100MG), por tubo/muestra y mezclar con 10 mL de solución buffer por tubo/muestra.
- 4.- Glucotall: Pesar en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 5 g de tiourea y colocarla en un matraz de fondo plano, adicionar 940 mL de ácido acético glacial y 60 mL 0-toluidine al 98%, homogeneizar y colocar la mezcla en un frasco color ámbar.

### **Procedimiento:**

- 1.- Moler las muestras deshidratadas de: grano, complemento, contenido duodenal y heces a un tamaño de criba de 1mm de diámetro.
- 2.-Pesar en una balanza analítica 0.15 g de muestra en caso de grano y 0.5 g en caso de contenido duodenal, heces y complemento.
- 3.- Colocar las muestras ya pesadas en tubos con capacidad de 25mL.
- 4.- Determinar 1 tubo blanco (sin muestra), así como 4 tubos estándar en los cuales se pesa (balanza analítica) en cada uno 0.09 y 0.135 g de almidón, papa soluble (polvo J.T. Baker) así como 0.09 y 0.135 g de dextrosa, anhidra (Polvo J.T. Baker). Éstos serán procesados de la misma manera de las muestras.
- 5.- Adicionar 10 mL de agua destilada a cada tubo/muestra. Tapar el frasco y agitar en el vórtex durante aproximadamente 1 minuto por tubo/muestra.

- 6.- Incubar las muestras en baño maría a 100° C por 3 horas. Homogeneizar cada tubo/muestra con ayuda del vórtex durante 10 minutos, la primera media hora, después cada 30 min hasta cumplir las 3 h. Sacar los tubos del baño maría y dejarlos enfriar 24 h.
- 7.- Adicionar 10 mL de solución buffer-enzimática a cada tubo/muestra más una gota de tolueno. Homogenizar la muestra.
- 8.- Incubar las muestras en baño maría a 50°C (máximo 55°C) por 3 horas. Agitar con el vórtex cada 20 minutos a cada tubo/muestra.
- 9.- Sacar las muestras del baño maría y adicionar 2 ml de ZnSO<sub>4</sub> al 15%. Agitar con el vórtex e introducir las muestras en agua con hielo durante 10 minutos, para detener la reacción de gelatinización.
- 10.- Filtrar aproximadamente 0.3 mL de la solución del tubo/muestra usando papel Whatman # 4.
- 11.- Enumerar los tubos de ensayo para glucosa y colocar 4 mL de glucotall en cada tubo.
- 12.- Con una pipeta automática, adicionar 50 µL del filtrado de muestra. Agitar con el vórtex y tapar los tubos con canicas e incubar en baño maría a 100°C por 10 min.
- 13.- Encender el espectrofotómetro UV/Vis y poner la longitud de onda a 630 nm 30 min antes de comenzar la lectura.
- 14.- Retirar los tubos del baño maría y colocarlos en agua con hielo durante 5 minutos. Agitar usando el vórtex.
- 15.- Poner en cero el espectrofotómetro y realizar la lectura el blanco, después con el almidón papa, posteriormente la dextrosa y finalmente las muestras.
- 16.- Analizar en un programa computacional los cálculos y obtener el % de almidón de las muestras.

## 2.5 Reactividad de la amiloglucosidasa (parte soluble del almidón)

### Reactivos:

- 1.- Solución de sulfato de zinc al 15% ( $ZnSO_4$  15%). Pesar en una balanza de precisión (Explorer Ohaus EIB120) 150g  $ZnSO_4$ , disolver en 1 litro de agua destilada.
- 2.- Solución buffer: acetato de sodio anhidro 9.91g (16.44 si es la forma trihidrada) disolver en 7.27 ml de ácido acético glacial llevar a 1000 ml en agua destilada.
- 3.- Solución enzimática: preparar diario. Pesar en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 0.55 mg de enzima amiloglucosidasa, de *Aspergillus niger*, (SIGMA A7420-100MG), por tubo/muestra y mezclar con 10 mL de solución buffer por tubo/muestra.
- 4.- Glucotall: Pesar en una balanza analítica 5 g de tiourea y colocarla en un matraz de fondo plano, adicionar 940 mL de ácido acético glacial y 60 mL 0-toluidine al 98%, homogeneizar y colocar la mezcla en un frasco ámbar.

### Procedimiento:

- 1.- Moler las muestras de grano seco a un tamaño de criba de 1mm de diámetro.
- 2.- Pesar en una balanza analítica 0.5 g de muestra.
- 3.- Colocar las muestras ya pesadas en tubos con tapa de rosca con capacidad de 25mL.
- 4.- Determinar 1 tubo blanco (sin muestra), así como 4 tubos estándar en los cuales se pesa (balanza analítica) en cada uno 0.09 y 0.135 g de almidón, papa soluble (polvo J.T. Baker) así como 0.09 y 0.135 g de dextrosa, anhidra (Polvo J.T. Baker). Éstos serán procesados de la misma manera de las muestras.
- 5.- Adicionar 10 mL de agua destilada, 10 mL de solución enzimática y una gota de tolueno a cada tubo/muestra. Tapar el frasco y agitar en el vórtex durante aproximadamente 1 minuto.
- 6.- Incubar las muestras en baño maría a 39° C (máximo 45 °C) durante 4 horas. Homogeneizar cada tubo/muestra cada 20 min hasta cumplir las 4 h.



- 7.- Sacar las muestras del baño maría y adicionar 2 ml de  $ZnSO_4$  al 15%. Agitar con el vórtex e introducir las muestras en agua con hielo durante 10 minutos.
- 8.- Filtrar aproximadamente 0.3 mL de la solución del tubo/muestra usando papel Whatman # 4.
- 9.- Enumerar los tubos de ensayo para glucosa, colocar 4 mL de glucotall en cada tubo.
- 10.- Con una pipeta automática, adicionar 100  $\mu$ l del filtrado de muestra. Agitar con el vórtex, tapar los tubos con canicas e incubar en baño maría a 100°C por 10 min.
- 11.- Encender el espectrofotómetro UV/Vis y poner la longitud de onda a 630 nm 30 min antes de comenzar la lectura.
- 12.- Retirar los tubos del baño maría y colocarlos en agua con hielo durante 5 minutos. Agitar usando el vórtex.
- 13.- Poner en cero el espectrofotómetro y realizar la lectura el blanco, después con el almidón papa, posteriormente la dextrosa y finalmente las muestras.
- 14.- Analizar en un programa computacional los cálculos y obtener el % de reactividad de la amilogucosidasa de la parte soluble del almidón.

## 2.6 Reactividad de la amiloglucosidasa (parte insoluble del almidón)

### Reactivos:

1.- Solución de sulfato de zinc al 15% ( $ZnSO_4$  15%). Pesarse en una balanza de precisión (Explorer Ohaus EIB120) 150g  $ZnSO_4$ , disolver en 1 litro de agua destilada.

2.- Solución buffer: Pesarse en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 8.71g de fosfato de potasio y adicionar 1 litro de agua desionizada. Ajustar a pH de 6 con 3 gotas de ácido clorhídrico RA.

3.- Solución enzimática: preparar diario. Por cada tubo/muestra pesarse en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 0.035 g carbonato de calcio, 0.55 mg de enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, (SIGMA A7420-100MG), 8 mg de  $\alpha$ -amilasa de páncreas de cerdo (Fluka 57 U/mg), 8 mg de pancreatin de páncreas porcino (SIGMA P-1625), 2 mg acromopeptidasa de *Achromobacter lyticus* (SIGMA A3547-500KU) y 2 mg de proteasa de páncreas bovino (SIGMA P-4630) y mezclar con 20 mL de solución buffer de fosfato de potasio por tubo/muestra.

4.- Glucotall: Pesarse en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140) 5 g de tiourea y colocarla en un matraz de fondo plano, adicionar 940 mL de ácido acético glacial y 60 mL 0-toluidina al 98%, homogeneizar y colocar la mezcla en un frasco de vidrio obscuro.

### Procedimiento:

1.- Moler las muestras de grano seco a un tamaño de criba de 1mm de diámetro.

2.- Pesarse en una balanza analítica (Explorer Ohaus EO2140), 0.15 g de muestra.

3.- Colocar las muestras ya pesadas en tubos con tapa de rosca con capacidad de 25 mL.

4.- Determinar 1 tubo blanco (sin muestra), así como 4 tubos estándar en los cuales se pesa (balanza analítica) en cada uno 0.09 y 0.135 g de almidón, papa soluble (polvo J.T. Baker) así como 0.09 y 0.135 g de dextrosa, anhidra (Polvo J.T. Baker). Éstos serán procesados de la misma manera de las muestras.

- 5.- Adicionar 20 mL de solución enzimática y una gota de tolueno a cada tubo/muestra. Tapar el frasco y agitar en el vórtex durante aproximadamente 1 minuto.
- 6.- Incubar las muestras en baño maría a 39° C durante 6 horas. Homogeneizar cada tubo/muestra cada 30 min hasta cumplir las 4 h.
- 7.- Sacar las muestras del baño maría y adicionar 2 ml de ZnSO<sub>4</sub> al 15%. Agitar con el vórtex e introducir las muestras en agua con hielo durante 10 minutos.
- 8.- Filtrar aproximadamente 0.3 mL de la solución del tubo/muestra usando papel Whatman # 4.
- 9.- Enumerar los tubos de ensayo para glucosa, colocar 4 mL de glucotall en cada tubo.
- 10.- Con una pipeta automática, adicionar 50 µl del filtrado de muestra. Agitar con el vórtex, tapar los tubos con canicas e incubar en baño maría a 100°C por 10 min.
- 11.- Encender el espectrofotómetro UV/Vis y poner la longitud de onda a 630 nm 30 min antes de comenzar la lectura.
- 12.- Retirar los tubos del baño maría y colocarlos en agua con hielo durante 5 minutos. Agitar usando el vórtex.
- 13.- Poner en cero el espectrofotómetro y realizar la lectura el blanco, después con el almidón papa, posteriormente la dextrosa y finalmente las muestras.
- 14.- Analizar en un programa computacional los cálculos y obtener el % de reactividad de la amiloglucosidasa de la parte insoluble del almidón, con los siguientes cálculos se estimará la digestibilidad ruminal *in vitro* del almidón.

#### **Cálculos:**

$$\% \text{ IRS} = (\text{IR}-\text{AGR})/6$$

Donde:

IRS = Almidón Reactivo insoluble

AGR = Reactividad de la amiloglucosidasa

6 = Número de horas de incubación *in vitro*

$$\% \text{ ISD} = (100-\text{AGR}) * ((\text{IRS}/(\text{IRS}+0.05))$$

Donde :

ISD = Almidón insoluble digestible

0.05 = Tiempo estimado de la tasa de pasaje (fracción por h) del grano en el rumen

$$\% \text{ PRSD} = 1.32 (\text{AGR}) + 0.39 (\text{ISD})$$

Donde:

PRSD = Predicción de la digestión ruminal del almidón

## 2.7 Determinación de Purinas (ácidos nucleicos)

Propósito: Este procedimiento será utilizado para analizar la concentración de ácido nucleico en muestras para calcular cantidad de proteína microbiana.

### Reactivos:

- 1.-  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  al 0.2 M (molar): 23.006g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  en 1 litro de agua destilada
- 2.-  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  al 0.0285 M: 143 mL de la solución 1 en 1 litro de agua destilada
- 3.-  $\text{AgNO}_3$  al 0.4 M: 6.79 g de  $\text{AgNO}_3$  en 100 mL de agua destilada
- 4.-  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a pH 2: 0.6 mL (concentración 96 - 98%) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 2 litros de agua destilada
- 5.- Mezcla de la solución 3 con solución 4: 0.6 mL de solución 4 más 25 mL de solución 3 en 2 litros de agua destilada.

### Procedimiento:

- 1.- Moler las muestras de contenido duodenal deshidratado a un tamaño de criba de 1mm de diámetro.
- 2.- Pesar en una balanza analítica 0.5 g de muestra y depositarlos en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 25 mL de capacidad.
- 3.- Estándares: en 3 tubos de ensayo con tapón de rosca de 25 mL de capacidad, pesar y agregar 0.1 g, 0.2 g y 0.3 g respectivamente de aislado bacteriano, adicionar 0.5 g de RNA estándar por cada uno.
- 4.- Adicionar 2.5 mL de  $\text{HClO}_4$  (60%) al cada de ensaye (muestras y estándares).
- 5.- Homogeneizar mediante vórtex cada tubo de ensayo.
- 6.- Colocar en baño maría a 90 – 95 °C por 1h. Después de 2 o 3 minutos agitar con vórtex para evitar la formación de un pellet, agitar nuevamente a los 5 y 10 minutos después.
- 7.- Sacar la muestra del baño y colocarlo en agua fría por 5 minutos.
- 8.- Agregar 17.5 mL de 0.0285 M de búffer amonio fosfato. Esperar 15 minutos, después homogeneizar con vórtex.

- 9.- En caso de que se halla formado un pellet, es necesario romperlo utilizando una barra de cristal.
- 10.- Poner en baño maría a 90 – 95 °C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo agitar mediante el uso del vórtex.
- 11.- Colocar en baño vibrador ultrasónico por 15 minutos (asegurarse de poner agua caliente en el vibrador).
- 12.- Filtrar aproximadamente 3 mL en el tubo utilizando papel filtro Whatman #2.
- 13.- Pipetear 0.5 mL del filtrado en un tubo de centrifugación de con capacidad de 12 mL.
- 14.- Agregar 0.5 mL de  $\text{AgNO}_3$  al 0.4 M en el tubo.
- 15.- Agregar 9 mL de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  al 0.2 M en el tubo.
- 16.- Cubrir los tubos de centrifuga con canicas y dejarlo toda la noche.
- 17.- Centrifugar a 6000 rpm, a 4 °C por 10 minutos.
- 18.- Decantar el líquido cuidadosamente (ser cuidadoso para no alterar la película que cubre al pellet).
- 19.- Agregar 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a pH 2 con  $\text{AgNO}_3$ .
- 20.- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos.
- 21.- Decantar cuidadosamente el líquido (puede verterse directamente de manera lenta).
- 22.- Agregar 10 mL de HCl a 0.5 N (normal) y agitar con el vortex hasta romper el pellet.
- 23.- Encender el espectrofotómetro y poner el sistema a 260 nm (UV).
- 24.- Poner el tubo en baño maría a 90 – 95 °C durante 30 minutos.
- 25.- Aspirar el sobrenadante del tubo.
27. Leer el blanco (HCl al 0.5 N) y enseguida las muestras, (si fuera necesario, diluir el estándar de RNA. Esto se hace combinando 0.5 mL del estándar con 9.5 mL de HCl 0.5 N).
- 28.- Cálculos de acuerdo a Zinn y Owens (1986).

## **2.8 Aislamiento de bacterias ruminales por centrifugación diferencial**

### **Procedimiento:**

- 1.- El último día de colección de muestras de todos los periodos obtener 4 h post consumo, aproximadamente 1 L de líquido ruminal mediante una bomba de vacío (Cole Parmer Instrument, Vernon Hill, IL.).
- 2.- El líquido obtenido será depositado en un matraz Erlenmeyer de capacidad de 2.5 L, al cual estará con CO<sub>2</sub> constante.
- 3.- Se transfiere a un frasco ámbar el líquido ruminal obtenido filtrándolo a través de 4 capas de gasa.
- 4.- Cuando se halla colectado 1 litro en total de líquido ruminal filtrado se adiciona en la misma proporción 1 L de NaCl al 0.6 N, (mantener el frasco a 40 ° C utilizando un termo)
- 5.- Depositar la mezcla de líquido ruminal con NaCl en tubos para centrifuga con capacidad de 25 mL.
- 6.- Centrifugar a 2750 rpm durante 10 minutos, hasta terminar con el total obtenido.
- 7.- Extraer el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 6000 rpm durante 20 minutos.
- 8.- Finalizada la centrifugación se formará un pellet de bacterias (aislado bacteriano), el cual será transferido a una caja de Petri.
- 9.- Colocar la caja de Petri con el aislado bacteriano en una estufa de desecación a 60 °C.

## 2.9 Cuantificación de cromo.

En este procedimiento se utilizan cenizas de aquellas muestras que contienen cromo como marcador (complemento - alimento, contenido duodenal y heces).

### Reactivos:

1.- Preparación de la solución de molibdato de sodio: Es necesario prepararla en una tina con agua fría. \*Pesar 0.40 g de Molibdato de sodio  $2\text{H}_2\text{O}$  (grado reactivo), adicionar 600 mL de agua desionizada, cuidadosamente adicionar 600 mL de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96-98 % en 6 tiempos, finalmente adicionar 800 mL de ácido perclórico  $\text{HClO}_4$  al 70 %

### Procedimiento:

- 1.- De las muestras compuestas de heces y contenido duodenal, así como complemento, pesar en una balanza analítica 1.5 g de muestra y depositarla en vasos de precipitados previamente identificados.
- 2.- Introducir en la mufla (LINDBERG, modelo 51894) a 600 °C durante 4 hrs para su calcinación y así obtener las cenizas de la muestra.
- 3.- Dejar enfriar las muestras, adicionar 15 mL de la solución de molibdato de amonio (éstas adquieren un color verde) y cubrirlas con un vidrio de reloj.
- 4.- Colocarse guantes y lentes de protección.
- 5.- Colocarlos en una parrilla a 400°C hasta su ebullición (para su re suspensión y oxidación) bajo una campana de extracción de gases.
- 6.- Conforme transcurre el tiempo sobre la parrilla, se notaran cambios de color de las muestras (de verde a naranja).
7. Cuando las muestras se tornen naranja se dejan 5 minutos más en ebullición y se retiran de la parrilla con unas pinzas para objetos calientes y se dejan enfriar.
- 8.- Transferir la muestra con un embudo de vidrio a matraces y aforar con agua desionizada a 100 mL. Tapar los matraces y agita rigurosamente para homogeneizar



- 10.- Filtrar la muestra con papel Whatman a botes de plástico con capacidad de 60 mL, el resto se deposita en contenedores de residuos químicos previamente identificados.
- 11.- Mantener en resguardo a temperatura ambiente las muestras hasta su lectura en el espectrofotómetro.
- 12.- Preparación de la curva estándar: Para la preparación de la curva estándar se preparó un estándar de cromo con una concentración de 1000 ppm. Pesar en una balanza analítica 1.0 g de óxido de cromo y repetir los pasos 2 al 8 que se siguieron en las muestras. Diluir el estándar a: 2.5, 5.0, 7.5 y 25  $\mu\text{g/mL}$  y depositarlos en frascos de plástico para su lectura.
- 13.- Encender el espectrofotómetro y ajustarlo a una longitud de onda de 430 nm, dejarlo en esas condiciones durante 30 min.
- 14.- Comenzar la lectura en el espectrofotómetro iniciando con el estándar, enseguida las muestras y finalmente de nueva cuenta el estándar.
- 15.- Con las lecturas obtenidas realizar los cálculos de la digestibilidad de los nutrientes y flujo de éstos al duodeno (Galyean, 1980).

## 2.10 Determinación de tamaño de partícula

### Adaptada de Baker y Hermann (2002)

#### Procedimiento:

1.- Pesar en una balanza de precisión 100 g de grano entero previamente deshidratado.

2.- Seleccionar 6 cribas de diferente tamaño y pesarlas en una balanza de precisión: las cribas utilizadas en este estudio fueron, USBS # 4 (4.76 mm), USBS # 5 (4.00 mm), USBS # 6 (3.36 mm), USBS # 7 (2.83 mm), USBS # 8 (2.38 mm) y USBS # 10 (2.00 mm).

3.- Colocar una criba sobre otra, de mayor a menor abertura, debajo de ésta última criba colocar un recipiente (base) para contener las partículas que pudieran atravesar todas las cribas.

4.- Introducir los 100 g de muestra sobre las cribas y colocarlas junto con el contenedor en un agitador de cribas (W.S. Tyler, modelo RX-812).

5.- Encender el agitador y mantener la agitación de las cribas durante 10 minutos.

6.- Retirar las cribas del agitador y pesar por separado cada una ellas incluyendo el agitador.

7.- Mediante sustracción obtener el peso de la muestra contenida en cada criba.

8.- Retirar la muestra contenida en cada criba y limpiar con aire a presión para volver a utilizarlas.

9.- Cálculos:

El tamaño de partícula promedio del material retenido en una criba se calcula como el promedio geométrico del diámetro de abertura de dos cribas adyacentes mediante la fórmula:

$$d_i = (d_u * d_o)$$

Donde:

$d_i$  = diámetro de la *iésima* criba

$d_u$  = diámetro de la abertura de la criba a través de la cual pasan los granos

$d_o$  = diámetro de la abertura de la criba a través de la cual no pasan los granos

El tamaño de partícula (TP) promedio se calcula con base en el peso de la muestra mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

$d_{gw}$  = diámetro de la media geométrica (TP)

$W_t$  = peso de la muestra contenida en la *iésima* criba

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

Donde:

$S_{gw}$  = desviación estándar geométrica

El número de partículas por gramo (P/g) y la superficie de área (SA) fueron calculados a partir de  $d_{gw}$  (TP) y la desviación estándar geométrica ( $S_{gw}$ ).

Para estos cálculos se consideró que los factores para una forma cúbica son:

$$\beta_s = 6 \text{ y } \beta_v = 1$$

Se utilizó el valor de densidad ( $\delta$ ) de 0.132 g/cm<sup>3</sup> que es un valor constante en los cereales. Debido a que la densidad está expresada en g/cm<sup>3</sup>, es necesario convertir el  $d_{gw}$  en centímetros, multiplicando el valor de  $d_{gw}$  por 0.0001. el cálculo de SA y P/g se realizó con la siguiente fórmula:

$$P/g = \frac{1}{\delta \beta_v} \exp \left( (4.5 (\ln S_{gw})^2) - 3 (\ln d_{gw}) \right)$$

$$SA \text{ (cm}^2\text{)} = \frac{\beta_s}{\delta \beta_v} \exp \left( 0.05 (\ln (S_{gw}^2)) - \ln d_{gw} \right)$$