



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMPARACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*, MEDIANTE INCUBACIÓN
CON LÍQUIDO RUMINAL O ENZIMAS, EN FORRAJES DE CEREALES DE
GRANO PEQUEÑO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LECHE EN
PEQUEÑA ESCALA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:
FELIPE DE JESÚS GONZÁLEZ ALCÁNTARA**

**ASESORES:
DR. CARLOS MANUEL ARRIAGA JORDÁN
DR. FELIPE LÓPEZ GONZÁLEZ
DR. IGNACIO ARTURO DOMÍNGUEZ VARA**

**REVISORES:
DR. JOSÉ LUIS BÓRQUEZ GASTELUM
DRA. ALEJANDRA DONAJÍ SOLÍS MÉNDEZ**



Toluca, Estado de México, Abril de 2016

RESUMEN

Uno de los parámetros que nos permite conocer la calidad de un alimento es la digestibilidad, existen diferentes métodos para medir la digestibilidad de un alimento, tanto *in vivo*, empleando métodos de colección total de heces, uso de marcadores (internos y externos), como *in vitro*, utilizando métodos con líquido ruminal, y enzimáticos, por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo estimar y comparar la digestibilidad de forrajes de cereales de grano pequeño, mediante dos métodos *in vitro* (con líquido ruminal), y enzimática utilizando una enzima exógena (Onozuka R-10). Se tomaron muestras de los forrajes, a los cuales se les determinó la composición química y la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica mediante la utilización de líquido ruminal y enzimas. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) en la digestibilidad de la MS con líquido ruminal o con enzimas (DIVMS 648.2; DEMS 644.8 g/kg MS) y de la MO (DIVMO 711.2, DEMO 707.4 g/kg MO), determinada con ambos métodos. Los resultados del análisis bromatológico de los forrajes de cereales de grano pequeño indicaron valores con rangos de proteína cruda (PC) de 72.16 a 154.2 g/Kg MS, de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FDA) de 337 a 631 g/Kg MS y 181 a 385.2 g/Kg MS, respectivamente. Se concluye que no existen diferencias significativamente estadísticas entre los dos métodos evaluados (con líquido ruminal y enzimas Onozuka R-10), por lo cual el método enzimático se puede utilizar para determinar la digestibilidad en forrajes de cereales.

PALABRAS CLAVE: Digestibilidad *in vitro*, líquido ruminal, método enzimático, forrajes de cereales.

INDICE

	PÁGINA.
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Digestibilidad en rumiantes	3
2.2. Métodos para determinar digestibilidad de alimentos	4
2.3. Técnicas de digestibilidad	4
2.3.1. Digestibilidad <i>in situ</i>	4
2.3.2. Métodos <i>in vivo</i>	4
2.3.2.1. El Método de colección total de heces (Método <i>in vivo</i>).....	5
2.3.2.2. Uso de marcadores.....	7
2.3.3. Digestibilidad <i>in vitro</i>	10
2.3.3.1. Por solubilidad (Tilley y Terry).....	11
2.3.3.2. Producción de gas <i>in vitro</i>	12
2.3.3.3. Método enzimático.....	12
2.4. Forrajes de cereales	13
2.4.1 Avena forrajera (<i>Avena sativa</i> , <i>Avena strigosa</i>).....	14
2.4.2. Triticale (<i>X Triticosecale</i>).....	14
2.4.3. Centeno (<i>Secale cereale</i>).....	16
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
6.3. Determinación de la digestibilidad	21
6.3.1. Método Daisy utilizando líquido ruminal.....	21
6.3.2. Método de digestibilidad enzimática de la materia orgánica (DEMO).....	24
VII. LÍMITE DE ESPACIO	28
VIII. LÍMITE DE TIEMPO	29
IX. RESULTADOS	30
9.1. Valor nutricional	30
9.1.1. Composición química.....	30
9.1.2. Digestibilidades <i>in vitro</i> de la MS.....	31
9.1.3. Digestibilidades <i>in vitro</i> de la MO.....	33
9.1.3. Energía Metabolizable (EM).....	35
X. DISCUSIÓN	37
XI. CONCLUSIONES	40

XII. SUGERENCIAS	41
IX. LITERATURA CITADA	42

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO (G/KG MS).....	31
CUADRO 2. DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA DE FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO ESTIMADA CON DOS TÉCNICAS <i>IN VITRO</i>	32
CUADRO 3. PROMEDIO TOTAL DE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MS DE LOS FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO	33
CUADRO 4. DIGESTIBILIDAD DE LA MO DE FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO ESTIMADA CON DOS TÉCNICAS <i>IN VITRO</i>	34
CUADRO 5. PROMEDIO TOTAL DE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MO DE LOS FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO.	35
CUADRO 6. ENERGÍA METABOLIZABLE DE LOS FORRAJES DE CEREALES DE GRANO PEQUEÑO	36

I. INTRODUCCIÓN

Las estrategias de alimentación para los sistemas de producción de leche en pequeña escala (SPLPE), deben tener como punto de inicio la fisiología digestiva de los bovinos lecheros, aunado al análisis de los recursos disponibles. La nutrición es parte fundamental en toda unidad de producción pecuaria, basado en el potencial productivo de un animal, sólo puede expresarse en la medida que sus necesidades de mantenimiento estén cubiertas y quede un excedente disponible para ser transformado en producto (Lachmann y Araujo, 2007). La calidad nutritiva de los forrajes está basada en el nivel de consumo, contenido de nutrientes, digestibilidad y eficiencia con que los forrajes pueden ser metabolizados y utilizados por los animales.

Una vez degradados los nutrientes de los forrajes, la digestibilidad se refiere a la cantidad de alimento que desaparece en el tubo digestivo o en un procedimiento de laboratorio debido a su solubilización o acción por los microorganismos anaerobios ruminales o enzimas. La determinación de la degradabilidad *in vitro* de los forrajes permite estimar la proporción de nutrientes presentes en el alimento, que tienen potencial de ser absorbidos en el tubo digestivo (Giraldo *et al.*, 2007). Church (1974), define la digestibilidad *in vivo* como la proporción del alimento que no es excretado en las heces y que se supone, por lo tanto, ha sido absorbido.

La metodología desarrollada para evaluar la digestibilidad de los alimentos para animales consiste en los métodos *in vivo* como la recolección total de heces, los marcadores (internos y externos), métodos *in situ* con la utilización de bolsas de nylon, además de los métodos *in vitro* con la incubadora Daisy Ankom con líquido ruminal o incubación enzimática (Osorio *et al.*, 2012), estos dos últimos son los dos métodos considerados en el presente experimento.

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar la digestibilidad de la MS y MO de muestras de forrajes de cereales de grano pequeño utilizados en la alimentación de ganado bovino lechero en sistemas de producción en pequeña escala por dos métodos: con líquido ruminal y con enzimas exógenas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Digestibilidad en rumiantes

El estómago de los rumiantes está constituido por cuatro cavidades, el retículo (red o redecilla), el rumen (panza), el omaso (librillo) y el abomaso (cuajar) o estómago verdadero. El estómago puede llegar a ocupar hasta el 75 % de la cavidad abdominal y junto con su contenido representa alrededor del 30 % del peso vivo del animal (Wattiaux y Terry, 2015).

Los rumiantes se caracterizan por degradar los carbohidratos estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies de estómago simple o no rumiantes. La degradación del alimento se realiza por la digestión fermentativa microbiana y no por acción de enzimas digestivas del animal; dicho proceso fermentativo los realizan diferentes tipos de microorganismos que el animal aloja en el retículo y rumen, dónde debe haber un medio adecuado para el desarrollo de estos microorganismos, los cuales realizan una simbiosis con el animal (Relling y Mattioli, 2003).

Los principales microorganismos que se encuentran en el rumen son bacterias, protozoarios, hongos y levaduras, los cuales se ubican en tres sitios diferentes en el rumen: 1) adheridos a la pared, estos hidrolizan a la urea y consumen el poco oxígeno que llega con el alimento, 2) asociados a partículas alimenticias, y 3) libres, flotando en el líquido ruminal (Van Lier y Regueiro, 2008).

En el rumen el animal crea y mantiene las condiciones ideales para el desarrollo de los microorganismos, tales como, anaerobiosis, aporte de nutrientes, pH de 5.5 a 6.9, presión osmótica y temperatura de entre 38 y 42°C. Sí el organismo no mantiene este pH favorece el desarrollo de otros microorganismos que pueden alterar el metabolismo del rumen y hacer que se desarrolle un desequilibrio en el sistema del animal (Relling y Mattioli, 2003).

2.2. Métodos para determinar digestibilidad de alimentos

La mayoría de los métodos de evaluación de forrajes tienen como objetivo determinar el valor nutricional de los forrajes, mediante técnicas de digestibilidad; estas se han estandarizando de acuerdo a los objetivos y necesidades de cada laboratorio, cada una tiene su complejidad, grado de especialización y costos.

2.3. Técnicas de digestibilidad

- *In situ* con bolsa de nylon
- *In vivo* mediante:
 - a) Colección total de heces
 - b) Marcadores (internos y externos)
- *In vitro* con los métodos de:
 - a) Tilley y Terry (Daisy Ankom Technology)
 - b) Digestibilidad enzimática
 - c) Producción de gas

2.3.1. Digestibilidad *in situ*

Este método se realiza en un animal vivo, en él se introducen bolsas de nylon con el forraje que se desea evaluar, sujetadas con peso para que permanezcan en el fondo del rumen, tiene la ventaja de que la muestra es fermentada en el rumen lo que permite medir la degradabilidad en función del tiempo de permanencia en el rumen; también se pueden medir diferentes factores ruminales que influyen sobre la tasa de digestibilidad, además de que se pueden introducir un mayor número de muestras (Huntington y Givens, 1995).

2.3.2. Métodos *in vivo*

El termino *in vivo* se refiere a la utilización de un animal o un conjunto de animales vivos, con los cuales a través de una dieta con un cierto forraje se puede medir la

cantidad de alimento que consume, al igual que la cantidad correspondiente de este forraje que es excretada en las heces. La diferencia entre lo consumido y lo excretado puede considerarse como lo digerido por el animal (Tabaré, 2015).

La digestibilidad *in vivo* puede verse afectada por diferentes factores tales como el consumo, velocidad de paso del alimento, oferta del alimento, la disponibilidad de agua, la capacidad de selección, la eficiencia metabólica y estado fisiológico del animal (Bochi-Brum *et al.*, 1999).

Dentro de los diferentes métodos para medir la digestibilidad *in vivo* destacan la colección total de heces y el método usando marcadores (Lachmann y Araujo, 1999), sin descartar que hay métodos que requieren animales fistulados quirúrgicamente, ya sea en rumen o duodeno.

2.3.2.1. El Método de colección total de heces (Método *in vivo*)

La colección total de heces (CTH) es el método más confiable para medir digestibilidad, ya que involucra directamente factores tanto del alimento como del animal (Basurto y Tejada, 1992). Este método incluye la medición del consumo de un determinado alimento, conociendo la cantidad y la colecta total de la excreción fecal correspondiente al alimento consumido.

$$\text{Coeficiente de digestibilidad (\%)} = [(NI - NH) / NI] \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

NI = Nutriente ingerido

NH = Nutriente en heces

Existen diversos métodos para recoger las heces, dependiendo de la especie, y en las condiciones que se encuentra (estabulado o pastoreo). En este método se

usan con preferencia machos, porque con ellos es más fácil recoger la orina y las heces por separado (Mc Donald, 1986).

Con ovinos y bovinos se pueden utilizar jaulas individuales de madera o metálicas, que permitan la colección de heces, ya sea por medio de separadores o con el uso de bolsas colectoras (Lazcano *et al.*, 1990). Las jaulas de digestibilidad, tienen como objetivo disminuir el movimiento del animal, estas además deben tener piso ranurado, para evitar el exceso de humedad y poder recoger las heces fecales (Cañas, 1995).

La recolección de heces se puede también realizar con la ayuda de sacos atados al animal (bolsas colectoras), conteniendo en su interior bolsas de polietileno utilizadas para recibir las heces fecales, permitiendo de esta manera ser retiradas de los arneses en cada ocasión para ser posteriormente pesadas, rotuladas y conservadas a -20°C, hasta su correspondiente análisis en el laboratorio.

Se debe de tener un periodo de adaptación a la nueva dieta de alimentación con el fin de que se acostumbren los microorganismos del rumen, ajustar la toma de alimentos hasta un nivel estable asegurando la totalidad de consumo del alimento reduciendo la variación en la medición de la digestibilidad aparente en la etapa de recolección de heces y que se elimine del tracto gastrointestinal cualquier residuo de alimentos precedentes (Church, 1974).

El periodo de recolección de heces debe durar de 3 a 14 días, el periodo más largo hace que los resultados obtenidos sean más exactos (Mc Donald, 1986).

Este método proporciona algunas ventajas pero a la vez tiene sus desventajas, es un método relativamente exacto pero demora mucho tiempo, poco práctico, presenta un leve sesgo respecto de la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces, requiere de grandes cantidades de muestras, largos períodos y su costo es elevado ya que requiere de

infraestructura especial, se debe asegurar que todas las excretas sean recogidas, evitar que se mezclen con la orina, impedir que se produzcan trastornos digestivos, y otros (Lascano *et al.*, 1990), se requiere de mucho personal para medir el consumo, recolectar las heces que se traduce además en un mayor tiempo y es laborioso, aumentando considerablemente los costos, se requiere utilizar varios animales con la finalidad de eliminar la diferencias que pudieran existir de origen digestivo en individuos de la misma especie, edad y sexo.

2.3.2.2. Uso de marcadores

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos físicos, como la tasa de pasaje, y químicos, como hidrólisis y síntesis, haciendo estimaciones cuantitativas o cualitativas de la fisiología nutricional (Lachmann y Araujo, 1999).

La dificultad de realizar la recolección total de heces excretadas, teniendo mayor énfasis en animales en pastoreo, propició el desarrollo de la técnica utilizando indicadores (internos o externos) (Rodríguez *et al.*, 2007). Los marcadores naturales o internos son materias no digeribles que se presentan naturalmente en los alimentos, los cuales no son digeridos ni absorbidos por el animal. Los indicadores externos son materias que bien se añaden a la dieta o se administran oral o intra ruminalmente a los animales (Church, 1974).

Para que una sustancia sea considerada como marcador ideal se deben de cumplir algunas características (Kobt y Luchey, 1972):

- Debe ser inerte y carecer de efectos tóxicos.

- No debe ser absorbida ni metabolizada en el tubo gastrointestinal.
- Debe carecer de volumen apreciable.
- Debe mezclarse íntimamente con el alimento y mantenerse uniformemente distribuido en la digesta.
- No debe influir sobre las secreciones gastrointestinales, digestión, absorción o motilidad normal.
- No debe influir sobre la microflora y microfauna del tracto gastrointestinal.
- Debe poseer propiedades físico químicas, fácilmente discernibles en la totalidad del tracto gastrointestinal, que permitan su determinación cuantitativa de forma simple y exacta.

Es difícil que exista algún indicador que reúna todas estas características, pero varias de estas sustancias reúnen la mayoría de los requerimientos para proporcionar datos significativos.

2.3.2.2.1. Marcadores internos

- Lignina: Es considerada como indigestible, según Fahey y Jung (1983), la estructura de la lignina es degradada o modificada mediante el paso a través del tracto gastrointestinal, por lo que la recuperación total de la lignina es baja.
- Sílice: Se encontró que el sílice es indigestible, por lo que se utilizó como un marcador, posteriormente descubrieron una cantidad de recuperación de sílice excesiva en las heces, en animales alimentados con piensos contaminados con polvo o tierra (Kobt y Luchey, 1972).
- Cenizas insolubles en ácidos: Al emplear cenizas del pienso que no se disuelve en HCL hirviendo se obtienen datos similares a los del método de recogida total de heces.

2.3.2.2. Marcadores externos

- Alimentos teñidos: El análisis con las partículas teñidas se debe efectuar mediante la inspección visual y conteo de las partículas teñidas en una determinada muestra de la dieta.
- Oxido crómico: Propuesto como indicador en 1918, tiene coloración verde oscura, insoluble en agua, alcohol y acetona, puede ser proporcionado en capsulas de gelatina, impregnado en papel filtro o en forma de pellets (Rodríguez *et al.*, 2007), destacado como el más antiguo y utilizado comúnmente como marcador externo.
- Elementos de tierras raras: Como Lantano (La), Samario (Sm), Cerio (Ce), Iterbio (Yb) y Disprosio (Dy).
- Fibra tratada con cromo mordante: El procedimiento llamado "mordante" determina la formación de fuertes complejos entre el cromo y las membranas de las células vegetales. Por lo que tiene un alto valor como marcador tanto para estudios de digestibilidad como para determinación del avance de la ingesta (Lachmann y Araujo, 2007).
- Marcadores hidrosolubles: Varios materiales reúnen características ideales como marcadores de la fase líquida de la digesta; por ejemplo el polietileno glicol (PEG), es muy soluble en agua, se recupera casi totalmente en las heces y ha sido utilizado durante muchos años como marcador en estudios efectuados con rumiantes.
 - ✓ Polietileno glicol (PEG)
 - ✓ Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)
 - ✓ Cr (Cromo)
 - ✓ Co (CoEDTA)
- Alcanos: Son introducidos en forma de pellets, presenta algunos inconvenientes como puede ser variaciones entre días en la excreción fecal (Kobt y Luchey, 1972).

Los dos métodos utilizados más ampliamente, usando los indicadores internos lignina y cromógenos, los cuales tienen problemas para llenar los requisitos que deben tener los indicadores.

La lignina se ha encontrado que no es completamente indigestible, se tienen problemas en la recuperación fecal, algunos estudios sugieren que los microorganismos del tracto gastrointestinal pueden ser los responsables de la degradación y o modificación de la estructura química de la lignina. Para los métodos de análisis se requiere de mucho tiempo.

El marcador externo más usado es el óxido crómico, pero la obtención de este varía mucho en animales en estabulación en comparación con animales en pastoreo; por lo que los resultados obtenidos en condiciones de estabulación no deberán aplicarse a estudios en condiciones de pastoreo (Lachmann y Araujo, 1992).

Las condiciones más apropiadas para el uso de indicadores es cuando se conoce el consumo de alimento, cuando los animales son alimentados con dietas que contienen el marcador o son dosificados oralmente con el marcador a intervalos regulares, posteriormente se toman muestras de heces cuando son excretadas o directamente del recto, cuando no se conoce ni el consumo de alimento ni la producción fecal.

2.3.3. Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* es un método que se basa en el principio de someter una muestra de alimento en un recipiente a la acción de inóculo de líquido ruminal o enzimas, con el fin de simular las condiciones naturales que ocurren en el rumiante de más de ocho semanas de vida, ya que antes su digestión es diferente al ser capaz de digerir solo leche pareciéndose a la digestión que realizan los monogástricos (Relling y Mattioli, 2003). Después de un determinado tiempo se

mide la cantidad de materia seca (MS), materia orgánica (MO) o celulosa que ha desaparecido durante la incubación, la proporción desaparecida se denomina digestibilidad *in vitro* (Tobal, 1999).

Como la determinación de la digestibilidad *in vivo* presenta importantes dificultades operacionales, se han propuesto una serie de métodos alternativos de laboratorio que estiman la digestibilidad mediante el uso de líquido ruminal (Tilley y Terry, 1963), solubilidad en detergentes (Van Soest, 1963) o enzimas celulolíticas (Jones y Hayward, 1975).

2.3.3.1. Por solubilidad (Tilley y Terry)

El método Tilley y Terry (1963) fue el precursor del método de fermentación *in vitro* en dos etapas, la primera etapa fermentativa con microorganismos contenidos en el líquido ruminal de animales canulados y posteriormente la segunda etapa enzimática con pepsina en un medio ácido, añadiendo ácido clorhídrico Ruiz (2011). Generalmente los métodos desarrollados posteriormente son en su mayoría modificaciones, como el propuesto por Schimd *et al.* (1975), que incorpora "buffer" como fuente de nitrógeno. Otra modificación al método Tilley y Terry es la de Van Soest *et al.* (1966), que sustituye la pepsina de la segunda etapa por solución detergente neutro para determinar FDA, es decir, solubiliza la pared celular bacteriana y los productos endógenos, además de la proteína (Cañas, 1995).

El método más utilizado es el método Tilley y Terry (1963), con modificaciones por Van Soest *et al.* (1966), usando el equipo DaisyII®- Ankom Technology; este permite la incubación simultánea de hasta 100 muestras diferentes, distribuidas en cuatro jarras (recipiente de vidrio de 4 L de capacidad), y mantiene el calor uniforme, además de una agitación constante durante el procedimiento de incubación, simulando la función del rumen. Así con esta técnica el material que

desaparece de las bolsas durante la incubación es considerado digerible (Giraldo *et al.*, 2007).

Este método permite el estudio de un gran número de muestras en un tiempo menor, requiere de pequeñas cantidades de muestra y tiene un costo menor en comparación con el método *in vivo* o colección total, es fácil de realizar, el grado de precisión obtenido es muy alto. El único inconveniente en este método es tener que mantener animales fistulados en el rumen, puesto que en investigaciones el uso de líquido ruminal de especies diferentes, se obtienen resultados diferentes.

2.3.3.2. Producción de gas *in vitro*

En este método se mide la producción de gas producido en un determinado momento, de una muestra con inóculo ruminal. Este sistema presenta la ventaja de que el gas producto final que se mide, es resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de registrar la desaparición de sustrato; otra ventaja es que la formación de productos finales de la fermentación, pueden ser monitoreados a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con precisión.

La técnica de producción de gas es una prueba *in vitro* de gran capacidad operativa y bajo costo, en la cual los perfiles de producción de gas pueden ser generados utilizando sistemas semi o totalmente automatizados (Bruni y Chilibroste, 2001).

2.3.3.3. Método enzimático

La prueba *in vitro* requiere una cantidad uniforme y confiable de inóculo ruminal que a menudo es difícil de obtener ya que se requiere de animales canulados, aunado a que existen diferentes factores que pueden dar variaciones en los resultados como la variación en la actividad del líquido ruminal, variaciones incontrolables que se dan dentro del laboratorio.

Por tal motivo se requiere de técnicas que proporcionen datos reales acerca de la digestibilidad de un alimento que no requieran de tanto tiempo, no ocupen animales canulados, dado esto se han empleado diferentes digestores, entre ellos una solución preparada con celulasa (Arce *et al.*, 2003).

El utilizar enzimas potencializa la estimación de la digestión ruminal de la proteína; hay factores que pueden modificar los resultados como el pH, tiempo de incubación, condición de saturación de las enzimas y la temperatura.

Por la actividad proteolítica de la flora microbiana se realiza la degradación de la proteína en el rumen y las bacterias celulolíticas son parcialmente dependientes de los aminoácidos y péptidos pre-formados. Las fracciones que sean degradadas y que proporcionen sustratos adecuados podrían proporcionar una buena respuesta para el crecimiento (Villalobos *et al.*, 2000).

Para que una enzima (E) actúe, es necesario que se forme un complejo entre ella y el sustrato (S). Este complejo (ES) se escinde después, dejando en libertad los productos (P) de la reacción y la enzima sin alterar (Acosta y Cárdenas, 2006): $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$.

2.4. Forrajes de cereales

Con los diferentes cambios que están sucediendo en el planeta con el cambio climático ocasionando periodos secos más prolongados, fríos más intensos, lluvias más fuertes y erráticas, entre otros. Uno de los principales efectos del cambio climático en el altiplano central de México sobre el régimen de lluvias que las hace más erráticas e inciertas, con periodos de sequía más prolongados, y menores precipitaciones totales. Esto influirá en menos cantidad de agua en cultivos ya sean temporales o de riego, con lo cual es necesario evaluar forrajes que puedan adaptarse a este cambio, estos son forrajes que necesiten menor cantidad de agua como es el caso de los forrajes de cereales de grano pequeño.

Dentro de un sistema de producción animal lo principal es obtener la mayor cantidad de carne o de leche por hectárea al menor costo posible, por lo que la producción de pasto durante el invierno es un punto importante, pero para que se obtenga una mayor producción se deben sumar otros factores como, eficiencia de cosecha, eficiencia de conversión, calidad de forraje, genética y sanidad (Tomoso, 2009).

La avena forrajera, el centeno forrajero y el triticale forrajero, son cultivos de cereales de grano pequeño con una excelente adaptación agroecológica (escasas precipitaciones y bajas temperaturas), de los que se puede obtener forraje en la época de invierno y obtener un mayor número de cosechas durante el año, ya que las pasturas perennes cultivadas o naturales en época de invierno presentan baja disponibilidad de forraje (Moreyra *et al.*, 2014).

Los forrajes de cereales de grano pequeño se pueden utilizar de diferentes formas, solos o en asociación con diferentes forrajes, ya sea para pastoreo, henificado, o alimentación en fresco.

2.4.1 Avena forrajera (*Avena sativa*, *Avena strigosa*)

Es el cereal forrajero de invierno más cultivado en el país, es de ciclo corto, bajo condiciones apropiadas de humedad permite obtener con facilidad dos cosechas al año, es resistente a heladas. Es un forraje de alta calidad, excelente palatabilidad y de fácil manejo.

2.4.2. Triticale (*X Triticosecale*)

Es un cereal creado artificialmente a partir del cruzamiento de trigo (*Triticum ssp.*) con centeno (*Secale ssp.*) con el fin de combinar la calidad nutritiva del grano del trigo en cuanto a nivel proteico y de aminoácidos, así como su productividad, con el vigor de la planta del centeno, su resistencia a la sequía, bajas temperaturas y limitantes del suelo (Mellado *et al.*, 2008), además de la resistencia a

enfermedades fungosas, adaptación a áreas que reciben mayor precipitación fluvial durante el invierno que en el verano (200 a 500 mm) (González *et al.*, 2004).

El triticale puede ser utilizado al igual que los otros forrajes de cereales de grano pequeño como monocultivo o mezclas con otros cultivos para obtener una mayor producción de forraje. En comparación con la avena, el triticale tiene una producción mayor de materia seca y otro punto importante es que mientras avanza su desarrollo fenológico presenta menor pérdida de calidad (Mendoza-Elos *et al.*, 2011).

2.4.3. Centeno (*Secale cereale*)

Puede ser utilizado con doble propósito, producción de forraje al igual que producción de grano, el atributo del centeno es su rusticidad que le brinda una excelente adaptación a condiciones de sequía, bajas temperaturas y suelos livianos, produce una gran cantidad de biomasa en poco tiempo y de manera eficiente en consumo hídrico. Puede realizarse varios cortes de forraje y pastoreo intensivos gracias a que tiene una buena capacidad de rebrote (Murillo *et al.*, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a las normas internacionales que restringen el uso de animales en la experimentación, se hace necesario utilizar métodos alternativos para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, uno de ellos es el uso de enzimas que entre otras ventajas no requiere del uso de animales fistulados, requiere menos tiempo, trabajo y esfuerzo en su realización, sin embargo existe poca información sobre la comparación entre el método enzimático y el de Ankom Daisy con líquido ruminal en la determinación de la digestibilidad en forrajes de cereales de grano pequeño, por lo que se hace necesario evaluar y comparar estos dos métodos para observar si la determinación de la digestibilidad es similar con líquido ruminal y con el uso de enzimas.

IV. HIPÓTESIS

No existen diferencias significativas en la determinación de la digestibilidad de la Materia Seca (MS) y Materia Orgánica (MO) en forrajes de cereales de grano pequeño (Avena, Triticale y Centeno), mediante dos técnicas de digestibilidad *in vitro*, con el método Ankom Daisy con líquido ruminal y el método enzimático.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la digestibilidad *in vitro*, de la MS y MO de los forrajes de cereales de grano pequeño (Avena, Triticale y Centeno), mediante los métodos Ankom Daisy con líquido ruminal y el enzimático y contrastar los resultados.

5.2. Objetivos específicos

- Valorar el método enzimático como técnica de rutina en laboratorio para la determinación de la digestibilidad de la MS y MO.
- Estimar el valor nutricional de los forrajes de cereales de grano pequeño (Avena, Triticale y Centeno), a través de la digestibilidad *in vitro*.
- Comparar la digestibilidad de la MS y MO con el uso de enzimas vs método Ankom Daisy con líquido ruminal.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Localización del sitio experimental

Las muestras de forrajes de cereales de grano pequeño (Avena, Triticale y Centeno), proceden del Municipio de Aculco, Estado de México, localizado a 20° 06' Norte y 99° 50' Oeste, a una altitud de 2,440 msnm. El clima de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2009).

Otras muestras de forrajes de grano pequeño (Avena y Triticale) proceden de Tepatitlán, Morelos, Jalisco, localizado en el occidente del país, en las coordenadas 20° 54' 50" y los 21° 01' 30" de latitud norte y los 102° 33' 10" a los 102° 56' 15" de longitud oeste a una altura de 1,800 msnm, su clima es semi seco cálido (CEDEMUN, 1986).

6.2. Toma y manejo de las muestras

Las muestras de forrajes de los cereales avena Variedad Saia, Avena Variedad Canadiense, Centeno y Triticale variedad Rio Grande, las cuales fueron colectadas en el Municipio de Aculco; corresponden a cultivos sembrados el 7 de junio de 2014 y cortados el 28 de agosto del 2014, a los 72 días post siembra; la siembra se realizó con una densidad de 120 kg/ha y se fertilizó con 100 Kg de urea (46% N), 80 kg de superfosfato triple (46% de P₂O₅) y 80 kg/ha de cloruro de potasio (50 %). También se tomaron muestras de Triticale Variedad Obsidiana y Triticale Variedad Bicentenario, cultivos sembrados el 5 de noviembre del 2014 y se cosechados el 5 de febrero de 2015. Además, se utilizaron muestras de Triticale Variedad Bicentenario que se sembró el 10 de octubre de 2014 y se cortó el 13 de enero de 2015; de igual manera se tomaron muestras de Avena Saia cortada el 11 de febrero de 2015.

También se analizaron muestras procedentes de Tepatitlán de Morelos, Jalisco las cuales son de avena variedad Obsidiana, Avena Variedad Karma, Avena Variedad

Chihuahua, Avena Variedad Turquesa; además de Triticale Variedad Bicentenario, de los cuales la fecha de siembra fue el 28 de enero y la cosecha el 23 de abril de 2015; los forrajes se encontraban en estado lechoso-masoso las densidades de siembra (60, 80 y 100 kg/ha).

Una vez tomadas las muestras de los forrajes fueron secadas a 65°C durante 48 horas en el horno de secado de circulación forzada y se procesaron en un molino pulvex 200, siendo molidas y tamizadas en una malla de 2 mm para después ser pesadas de acuerdo a la cantidad requerida para cada técnica en bolsas F57 con un tamaño de poro de 25 µm y dimensiones de 5 x 4 cm fabricadas de poliéster/polietileno con filamentos extruidos en una matriz de tres dimensiones (Giraldo *et al.*, 2007). Se registró el peso de la bolsa y el peso de la muestra, identificándolas con marcador resistente a acetona, 0.50 g de muestra para la digestibilidad con líquido ruminal y 1.0 g para la digestibilidad mediante enzimas; las cenizas se determinaron en un horno mufla a 550°C (Castro *et al.*, 1991) de cada una de las muestras evaluadas.

6.3. Determinación de la digestibilidad

Un alimento puede ser definido como cualquier componente de la ración que provee nutrientes al organismo. Por lo tanto, la digestibilidad hace mención a la cantidad de nutrientes que el organismo utiliza para satisfacer sus necesidades, y que no son excretados. Las técnicas de digestibilidad *in vitro* son herramientas muy útiles para conocer la cantidad que el animal aprovecha de cada alimento, a continuación se describen las técnicas *in vitro* que serán comparadas, para conocer si existen diferencias entre ambas.

6.3.1. Método Daisy utilizando líquido ruminal

El funcionamiento del equipo consiste en establecer condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*, esto es realizado en 4 frascos con una

mezcla líquida de 2 L incluyendo soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso, siendo conformada por dos soluciones durante la incubación (A y B), en unas proporciones de 1.330 L de solución A y 266 ml de solución B, esto para ajustar un pH de 6.8, más 400 ml de líquido ruminal y una tercera solución después de la incubación (C); siendo constituidas las soluciones de los siguientes reactivos (Ankom Technology, Operator's Manual DaisyII Incubator):

A.	Solución A:	g/L
○	KH ₂ PO ₄	10.0
○	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
○	NaCl	0.5
○	CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1
○	Urea	0.5
B.	Solución B:	
○	Na ₂ CO ₃	15.0
○	Na ₂ S•9H ₂ O	1.0
C.	Solución detergente neutro	

Una vez realizadas las soluciones serán colocadas en un baño maría a una temperatura de 39°C siendo la temperatura óptima para mantener en buenas condiciones a los microorganismos ruminales, mientras es colectado el líquido de los animales donadores en termos previamente llenados con agua caliente y vaciado al momento de la colecta para evitar un cambio de temperatura drástico para tales organismos. El líquido ruminal será colectado de un bovino hembra adulta de raza Holstein o también llamada Frisona, fistulada del rumen, con un peso promedio de 500 kg.

Una vez colectado el líquido ruminal se mezclará en cada frasco con las soluciones A y B en las proporciones ya dichas, para un máximo de 23 muestras y un blanco (bolsa vacía y sellada sin muestra) previamente identificadas y registradas para ser saturadas con CO₂ durante 5 minutos y después ser colocados en el equipo Daisy (Ankom Tehcnology) previamente calentado a 39°C, iniciando la incubación de 48 h.

Una vez transcurridas las 48 horas, se vaciará el líquido y se realizará un pre enjuague de las muestras con agua destilada fría para después ser procesadas en el analizador de fibras (Ankom 200), usando la solución neutro detergente a una temperatura de 100°C durante una hora, completamente cerrado, para después realizar tres lavados a una temperatura de entre 70 y 90°C con agua destilada, añadiendo 4 ml de alfa amilasa a los dos primeros enjuagues y terminar exprimiendo el exceso de agua cuidadosamente. Después de terminar el proceso y los enjuagues en el equipo Ankom 200, las muestras serán remojadas durante 5 minutos en acetona para después colocarlas en una superficie y dejarlas secar por aire; una vez secas se meterán a una estufa a 102 ± 2°C durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo se meterán en bolsas herméticas aplastándolas para remover el aire y se enfriaran a temperatura ambiente para proceder al pesado.

Degradación

$$DEGRADACION = \left[W_3 - (W_1 + \text{peso de la muestra degradada} - W_4) \right] / (W_3)$$

Dónde:

W₁=Peso de la bolsa

W₂=peso de la muestra +peso de la bolsa

W₃ (peso de la muestra seca)= (W₂-W₁)*contenido de materia seca (g.g⁻¹)

W₄ = Peso de la bolsa corregida (peso del blanco final/peso del blanco inicial)

6.3.2. Método de digestibilidad enzimática de la materia orgánica (DEMO)

Al igual que la técnica con líquido ruminal, el principio de funcionamiento del equipo es prácticamente igual, en establecer condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*, utilizando los 4 frascos con una mezcla líquida, pero con ciertas diferencias como realizar antes de la incubación el proceso de FND de las muestras, para después procesarlas con las enzimas Onozuka R10, la cual contiene 1.0 U/mg de celulasa, 0.4 U/mg de pectinasa, 0.6 U/mg de α -amilasa y 0.01 U/mg de proteasas; con esta técnica se realizará un experimento similar al realizado por Riveros y Argamentaría (1987).

Siendo un proceso en el siguiente orden después de identificar y registrar las muestras de un peso de 1g.

Fibra neutro detergente (FND)

Mediante el equipo Ankom 200, se someterán muestras a digestión con la solución neutro detergente a una temperatura de 100°C durante una hora, completamente cerrado, para después realizar tres lavados a una temperatura de entre 70 y 90°C con agua destilada, añadiendo 4 ml de alfa amilasa a los dos primeros enjuagues, y terminar exprimiendo el exceso de agua cuidadosamente. Después de terminar el proceso y los enjuagues en el equipo Ankom 200, las muestras serán remojadas durante 5 minutos en acetona para después colocarlas en una superficie y dejarlas secar por aire; una vez secas, se meterán a una estufa a 102 \pm 2°C durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo se meterán en bolsas herméticas aplastándolas para remover el aire y se enfriarán a temperatura ambiente para proceder al proceso de incubación.

Reactivos

- 0.1g de cloranfenicol que servirá como antifungico
- 1g de celulasa “Onozuka” R-10
- 13.6g de acetato sódico trihidratado
- 5.9ml de ácido acético glacial 100% pureza
- 1L de agua destilada
- Agua destilada (para lavados)

Es importante que para la realización de la solución, se haga primeramente la disolución de acetato sódico trihidratado en 1L de agua destilada a 40°C y por separado 5.9 ml de ácido acético glacial en otro litro de agua destilada a 40°C para revisar continuamente el pH mientras se añade la solución de ácido acético y obtener el pH final entre 4.6 y 4.7; una vez realizado esto se añadirá 1g de celulasa y 0.1g se cloranfenicol a la solución acético-acetato; de la solución final por cada 25ml se colocará una muestra en el frasco de incubación.

Método

- Una vez realizada la solución, se colocarán las bolsas F57 con los residuos de FND en un frasco de Ankom Daisy.
- El equipo deberá estar previamente calentado a 40°C para iniciar la rotación y cuando el termostato marque los 40 °C comenzará la incubación de 24 horas.
- Pasadas las 24 horas se sacaran los frascos y se destaparán con cuidado enjuagando las muestras con agua destilada previamente calentada aproximadamente a 60°C, realizando 5 enjuagues (se calentará el equivalente a la cantidad de muestras 25 ml por muestra).
- Una vez concluido se colocara cada muestra en charolas de aluminio en la estufa a 103±1 °C durante 12 h.

- Pasadas las 12 horas se retirarán las charolas en desecadores donde estarán durante 30 minutos procediéndose después a pesarlas (en la misma balanza que se pesaron las bolsas para FND).
 - Anotar como
 - Tara + residuo de incubación
- Se tomaran las charolas y se introducirán en una mufla previamente caliente a 550°C durante 1.5 horas.
- Acabada la incineración se abrirá y apagará la mufla y con pinzas se colocaran las charolas en desecadores donde permanecerán por una hora para después pesar.
 - Anotar como
 - Tara + cenizas de incubación

Cálculos

$$\% \text{DEMO} = \frac{\text{MO inicial} - ((\text{Tara} - \text{residuos incubación}) - (\text{Tara} + \text{cenizas de incubación}))}{\text{MO inicial}} * 100$$

Dónde:

MO inicial = materia orgánica inicial

$$\text{MO inicial} = \frac{(\text{materia seca} - \text{cenizas}) * \text{peso muestras (g)}}{100}$$

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante la prueba “t” de Student utilizando la media de las diferencias entre ambas muestras (Scheffler, 1979).

$$t = \frac{\text{Diferencia de las medias}}{EEDM}$$

Donde:

EEDM= Error estándar de las diferencias de las medias

VII. LÍMITE DE ESPACIO

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), campus Universitario “El Cerrillo” Piedras Blancas, Toluca, Estado de México C.P. 50090; las muestras proceden del municipio de Aculco Estado de México y de Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

VIII. LÍMITE DE TIEMPO

El experimento comenzó en febrero y concluyó en octubre de 2015. Tiempo en el que se realizó la identificación de las muestras, el análisis químico de los forrajes, digestibilidades tanto con líquido ruminal y enzimática utilizando (Onozuka R-10) e interpretación de los resultados.

IX. RESULTADOS

9.1. Valor nutricional

9.1.1. Composición química

Los forrajes de cereales de grano pequeño han demostrado ser una buena alternativa de alimentación en época de invierno; y con respecto al cambio climático han demostrado buena calidad nutricional.

En el Cuadro1 se muestran los resultados de la composición química de los forrajes de grano pequeño, en el cual se observa que la MS es el resultado de la extracción de la humedad del forraje, está formada por una fracción orgánica y otra inorgánica. Los forrajes evaluados en este estudio tienen un rango de MS entre 140 y 348.9 g/kg MS, encontrándose el valor mayor en el Triricale Bicentenario con 292 g/kg MS, perteneciente del municipio de Aculco, y Triricale Bicentenario con 344.9 g/ kg MS, proveniente de Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

Las cenizas, que son la parte inorgánica de los forrajes y en ellas están contenidos los minerales, mostraron mayor concentración en los forrajes de cereales pertenecientes a Tepatitlán, con un promedio de 97.3 g/kg MS en comparación con los forrajes del municipio de Aculco con un promedio de 86.3 g/kg MS.

La materia orgánica, comprende los nutrientes que se pueden degradar en el organismo para obtener energía (proteínas, carbohidratos y lípidos), se encontraron valores mayores numéricamente en los tritricales Bicentenario 979 y 934.4 g/kg MS del municipio de Aculco, en comparación con tritricales bicentenario de Tepatitlán con valores de 901.8 g/kg MS.

Sin embargo, en la determinación de PC, la Avena Saia obtuvo un promedio de 154.2 g/kg MS, por el contrario los demás forrajes de cereales tienen un rango de PC de 72.16 a 118.2 g/kg MS.

En relación a la Fibras Detergente neutro (FDN) y Detergente Acida (FDA), se encontraron valores promedios en el municipio de Aculco de 545.2 y 312.9 g/kg MS, respectivamente, mientras que en Tepatitlán de Morelos los valores promedio son de 612.3 y 336 g/kg MS.

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

Forraje	MS	Cenizas	MO	PC	FND	FDA
Avena Saia *	140.0	124.2	875.8	91.0	537.7	361.6
Avena Canadiense*	161.6	108.3	891.7	86.2	545.9	362.7
Centeno*	215.0	88.3	911.7	77.2	627.4	384.8
Triticale Rio Grande *	161.8	98.3	901.7	72.16	623.7	385.2
Avena Saia**	248.9	78.0	915.0	154.2	377.0	181.0
Triticale Bicentenario**	215.0	65.6	934.4	94.1	535.3	266.5
Triticale Obsidiana**	235.0	63.2	936.8	109.8	527.6	256.7
Triticale Bicentenario **	292.0	68.5	979	91.0	587.0	305.0
Triticale Bicentenario***	344.9	98.7	901.8	118.1	604.5	325.8
Avena Obsidiana***	318.3	109.7	890.3	107.3	616.2	348.3
Avena Turquesa***	284	84.9	915.1	118.2	631.6	340.4
Avena Karma***	334.7	90.9	909.1	109.6	598.3	334.9
Avena Chihuahua***	316	102.3	897.7	115.5	605.7	330.5

(*, **) Forrajes Aculco; (***) Forrajes de Tepatitlán, MS= Materia Seca; MO= Materia Orgánica; PC= Proteína Cruda; FND= Fibra Neutro Detergente; FDA= Fibra Acido detergente.

9.1.2. Digestibilidades *in vitro* de la MS

El Cuadro 2 muestra la digestibilidad con líquido ruminal y la digestibilidad enzimática utilizando celulase (Onozuka R-10), en las cuales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las dos técnicas usadas.

Los promedios de las digestibilidades de los forrajes están por arriba de 600 g/kg MS en las dos técnicas de digestibilidad *in vitro*, los valores fueron ligeramente mayores en la avena Saia con 710.2 g/kg MS con líquido ruminal y 704.9 g/kg MS con digestibilidad enzimática .

Según la zona de procedencia de las muestras, los resultados indican que la digestibilidad de la MS de los forrajes de Aculco fueron mayores, con un promedio de 664.5 g/kg MS con DIVMS y 658.9 g/kg MS con DEMS, en comparación con los de Tepatitlán de Morelos que fueron 622.3 g/kg MS con DIVMS y 622.2 g/kg MS con DEMS.

Cuadro 2. Digestibilidad de la materia seca (g/kg MS) de forrajes de cereales de grano pequeño estimada con dos técnicas *in vitro*.

Forraje	DIVMS	DEMS	(P>0.05)
Avena Saia*	711.4	704.0	NS
Avena Canadiense*	685.8	692.8	NS
Centeno*	601.5	604.3	NS
Tritricale Rio Grande*	648.2	620.0	NS
Avena Saia**	710.2	704.9	NS
Tritricale Bicentenario**	637.0	638.8	NS
Tritricale Obsidiana**	655.4	661.0	NS
Tritricale Bicentenario 5 **	666.3	645.8	NS
Tritricale Bicentenario***	622.8	611.3	NS
Avena Obsidiana***	633.7	636.8	NS
Avena Turquesa***	609.0	627.7	NS
Avena Karma***	618.8	604.6	NS
Avena Chihuahua***	627.0	630.5	NS

(*, **) Forrajes Aculco; (***) Forrajes de Tepatitlán, DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de materia seca (Líquido ruminal), DEMS=Digestibilidad enzimática de materia seca (Onozuka R-10).

En el Cuadro 3 se muestra el promedio general de la digestibilidad de la materia seca donde los valores son similares con ambas técnicas (con líquido ruminal y con enzimas), donde $P > 0.05$.

Cuadro 3. Promedio general de la digestibilidad de la MS de los forrajes de cereales de grano pequeño

Variable	Media	EEM ¹	Probabilidad
DIVMS (g kg ⁻¹ MS)	648.2		
		3.7	P>0.05
DEMS (g kg ⁻¹ MS)	644.8		

EEM¹= Error estándar de la media, DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de materia seca (Líquido ruminal), DEMS=Digestibilidad enzimática de materia seca (Onozuka R-10).

9.1.3. Digestibilidades *in vitro* de la MO

En el Cuadro 4 se muestran las digestibilidades de la MO con ambas técnicas en las que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$).

Cuadro 4. Digestibilidad de la materia orgánica (g/kg MO) de forrajes de cereales de grano pequeño estimada con dos técnicas *in vitro*.

Forraje	DIVMO	DEMO	(P>0.05)
Avena Saia*	812.3	803.9	NS
Avena Canadiense*	769.1	776.9	NS
Centeno*	659.7	662.8	NS
Tritricale Rio Grande*	718.9	687.6	NS
Avena Saia**	776.1	770.3	NS
Tritricale Bicentenario**	681.8	683.7	NS
Tritricale Obsidiana**	699.6	705.6	NS
Tritricale Bicentenario 5 **	680.6	659.7	NS
Tritricale Bicentenario***	690.6	677.8	NS
Avena Obsidiana***	711.7	715.2	NS
Avena Turquesa***	665.5	685.9	NS
Avena Karma***	680.7	665.0	NS
Avena Chihuahua***	698.5	702.3	NS

(*, **) Forrajes Aculco; (***) Forrajes de Tepatitlán, DIVMO= Digestibilidad *in vitro* de materia orgánica (Líquido ruminal), DEMO=Digestibilidad enzimática de materia orgánica (Onozuka R-10).

En el cuadro 5 se observan el promedio general de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, en el cual no se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), entre ambos métodos evaluados.

Cuadro 5. Promedio general de la digestibilidad de la MO de los forrajes de cereales de grano pequeño.

Variable	Media	EEM ¹	Probabilidad
DIVMO (g kg ⁻¹ MO)	711.2		
		4.0	P>0.05
DEMO (g kg ⁻¹ MO)	707.4		

EEM¹= Error estándar de la media, DIVMO= Digestibilidad *in vitro* de materia orgánica (Líquido ruminal), DEMO=Digestibilidad enzimática de materia orgánica (Onozuka R-10).

9.1.3. Energía Metabolizable (EM)

Para estimar la EM se utilizaron los valores promedio de la digestibilidad *in vitro* de la materia Seca (DIVMS), la estimación se realizó con base en la metodología de Kiraz et al. (2011). Una vez calculada la EM se transformó a Mega Joulios (MJ).

$$DE \text{ (Mcal/kgMS)} = 0.27 + 0.0428 * DMS \text{ (\%)}$$

$$ME \text{ (Mcal/kgMS)} = 0.821 * DE$$

DE= Energía digestible

ME= Energía metabolizable

DMS: Digestibilidad de Materia seca

En el Cuadro 6 se muestran los valores de energía metabolizable, en el cual se encontró, numéricamente, mayor concentración en la Avena Saia con 10.7 MJ EM/kg MS con respecto a las demás variedades de avenas, con valores promedio de 9.6 MJ EM/kg MS, y respecto a las variedades de triticales y centeno con valores promedio de 9.8 MJ EM/kg MS y 9.1 MJ EM/kg MS, respectivamente.

Cuadro 6. Energía metabolizable de los forrajes de cereales de grano pequeño.

Forraje	EM (MJ/kg MS)
Avena Saia*	10.7
Avena Canadiense*	10.4
Centeno*	9.1
Tritricale Rio Grande*	9.8
Avena Saia**	10.7
Tritricale Bicentenario**	9.6
Tritricale Obsidiana**	9.9
Tritricale Bicentenario **	10.1
Tritricale Bicentenario***	9.4
Avena Obsidiana***	9.6
Avena Turquesa***	9.2
Avena Karma***	9.3
Avena Chihuahua***	9.5

(*, **) Forrajes Aculco; (***) Forrajes de Tepatitlán

EM=Energía Metabolizable

X. DISCUSIÓN

En la época de invierno, así como para enfrentar al cambio climático, se requiere tener forraje de buena calidad para alimentar al ganado lechero, de forma que la producción no se vea tan afectada; por lo tanto, se requiere que los forrajes proporcionen los nutrientes requeridos para la producción de leche y no se tenga que recurrir a comprar concentrados.

Los resultados de proteína encontrados en las avenas 107.3 a 154.2 g/kg MS son diferentes a los reportados por Núñez *et al.* (2010), quienes obtuvieron valores de 133 a 177 g/kg MS en el norte del país. En el caso del triticale se obtuvo valores de proteína de 72.16 a 109.8 g/kg MS, inferiores a los reportados por Salcedo *et al.* (2014) de 192 g/kg MS para diferentes variedades de triticale.

En comparación con los forrajes de Aculco, los de Tepatitlán mostraron numéricamente mayor contenido de PC, pero menor valor de digestibilidad, lo cual se debe a que al ser procedentes de una región tropical, típicamente estos tienen procesos de crecimiento y maduración más rápidos, lo que hace que la digestibilidad de los forrajes sea menor por un aumento normal del contenido de fibra.

Según Di Marco (2011), considera a un forraje de alta calidad cuando presenta aproximadamente el 70% de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), menos de 50% de fibra detergente neutra (FDN) y más de 15% de proteína cruda (PC), independientemente de la metodología utilizada para su análisis. Por lo contrario, en uno de baja calidad la DIVMS disminuye a menos del 50%, la FDN sube a más del 65% y la PC baja a menos de 8%.

Los resultados de los análisis bromatológicos de los forrajes evaluados en este estudio demuestran que son de calidad media puesto que tienen más del 500g/kg MS de FDN; el Centeno y el Triticale Rio Grande, Triticale Bicentenario, avenas

variedades (Obsidiana, Turquesa y Chihuahua), tienen más de 600 g/kg MS de FND, con un promedio de PC de 103.4 g/kg MS y una digestibilidad mayor de 600 g/kg MS.

Se considera que el principal parámetro que define la calidad de un forraje es la digestibilidad de la materia seca, por lo tanto destaca la Avena Saia con valores de digestibilidad de 710.2 g/kg MS, y un valor de FDN de 377 g/kg MS, considerándose de buena calidad según lo referido por Di Marco (2011).

De los forrajes evaluados, las avenas mostraron mayor digestibilidad, desde 609.0 hasta 711.4 g/kg MS, similar a los resultados reportados por algunos autores como Villareal *et al.* (2012) y González *et al.* (2012) en los Altos de Jalisco, quienes reportan digestibilidades para Avena de 618.0 g/kg MS y 650.0 g/kg MS, respectivamente en el sur de Jalisco.

En el caso de la Avena Karma se encontraron valores de 618.8 g/kg MS, diferentes a los valores reportados por Ramírez *et al.* (2015) y Ramírez (2007), con valores de 650.0 g/kg MS y 633.0 g/kg MS, respectivamente.

Con los métodos de digestibilidad *in vitro* (líquido ruminal y enzimática), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Estos resultados son similares a los reportados por Torres *et al.* (2009), quienes compararon estos dos métodos, evaluando forraje rye grass con 716 g/kg MS con licor ruminal y 709 g/kg MS con enzimática; de igual forma, el heno de alfalfa tuvo 689 y 680 g/kg MS, respectivamente con los dos métodos; según Barchiesi-Ferrari *et al.* (2010), reportaron en ensilados de avena y diferentes pastos (*Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Bromus catharticus* Vahl var. *catharticus*, *Trifolium repens* y *Holcus lanatus*, *ballica Italiana* (*Lolium multiflorum* Lam. cv. *Tama*), variaciones en las digestibilidades medidas con los dos métodos, a diferentes cantidades de celulasa y a diferentes etapas de desarrollo de los forrajes, reportando mayor variación en plantas maduras.

Reyes (2015), comparando estas dos mismas técnicas, evaluó praderas compuestas por pastos ballico perenne y anual (*Lolium perenne* y *L. multiflorum*), pasto Orchard (*Dactylis glomerata*), alta fescue (*Festuca arudinacea*), y pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) asociadas con trébol blanco (*Trifolium repens*) y en menor cantidad trébol rojo (*T. pratense*), no encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos, reportó valores de 779.0 g/kg MS con líquido ruminal y 756.1 g/kg MS con enzimas utilizando Onozuka R-10.

Los resultados de fibras encontrados en el presente estudio muestran que el Centeno y Triticale variedad Rio Grande, además de avena variedad (Obsidiana Turquesa y Chihuahua), forrajes con mayor contenido de FDN y FDA tiene una relación directa con una menor digestibilidad. El contenido menor de FDN y FDA causa una digestibilidad mayor, como se pudo observar en los resultados encontrados en los análisis *in vitro* de la Avena Saia.

Los alimentos que presentan una baja calidad tienden a permanecer mayor tiempo en el rumen por su lenta digestión y tránsito, produciendo un efecto de llenado en el rumen y limitando el consumo, debido a que la vaca consumirá más alimento una vez que se haya vaciado por las partículas degradadas, es por ello que un forraje con altos niveles de FDN produce una disminución en el consumo de materia seca (Teuber *et al.*, 2007).

XI. CONCLUSIONES

El método de digestibilidad enzimática es un procedimiento relativamente simple de implementar en el laboratorio, más rápido que el método con líquido ruminal para estimar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y materia orgánica de los forrajes de cereales de grano pequeño.

El método enzimático puede ser utilizado como prueba rutinaria en el laboratorio para la determinación de la digestibilidad de los forrajes de cereales de grano pequeño.

Los forrajes de cereales son una excelente alternativa para obtener forraje de calidad en épocas invernales, además de que se pueden sembrar para obtener varios cortes al año y son una excelente alternativa frente al cambio climático, gracias a las características de resistencia por parte de las plantas. Destacan las avenas por su mayor calidad nutricional en comparación con el resto de los forrajes de cereales de grano pequeño.

Las avenas son mejor opción de los forrajes de cereales de grano pequeño, para su posible inclusión en la alimentación del ganado lechero en los sistemas de producción de leche ante los acelerados retos del cambio climático.

La avena Saia tiene mayor contenido numéricamente de proteína que las otras variedades de avenas como la Canadiense, Obsidiana, Turquesa, Karma o Chihuahua.

XII. SUGERENCIAS

A nivel de laboratorio se sugiere la determinación de la digestibilidad de los forrajes con los métodos *in vitro* usados; a nivel de campo, se sugiere la inclusión de forrajes de cereales de grano pequeño en la alimentación de ganado lechero en los sistemas de producción de leche a pequeña escala con el fin de tener forraje de calidad, lo cual ha sido una adecuada forma de utilizar y aprovechar la tierra después de algún otro cultivo como es el caso del maíz, por lo que se sugiere:

Seguir haciendo análisis de más forrajes de cereales de grano pequeño asociadas con otro tipo de forrajes como leguminosas como es el caso del Ebo (*Vicia sativa* L).

Evaluar otras variedades de los cultivos evaluados anteriormente, a fin de tener más información sobre su comportamiento en términos de productividad, composición química y digestibilidad y tener así un margen más amplio de forrajes que puedan adaptarse a las necesidades productivas de los SPLPE.

Seguir haciendo comparaciones entre los dos métodos usados para la determinación de la digestibilidad en más variedades de forrajes de cereales, además de otros forrajes y granos, esto para que el método enzimático ya se pueda utilizar, como un método de rutina para la determinación *in vitro* de la digestibilidad.

IX. LITERATURA CITADA

- Acosta A y Cárdenas M. (2006): Enzimas en la alimentación de las aves. *Fitasas Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40 (4):337-387.
- Ankom Tehcnology, Operator's Manual DaisyII Incubator (consultado: 16 julio 2015) <https://ankom.com/instrument-manuals.aspx>.
- Arce CP, Arbaiza TF, Carcelén CF, Lucas AO. (2003): Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 14 (1): 7-12.
- Barchiesi-Ferrari C, Alomar D, Miranda H. (2011): Pepsin cellulase digestibility of pasture silages: effects of pasture type, maturity stage, and variations in the enzymatic method. *Chilean Journal of Agricultural Research*; 71(2):249-257.
- Basurto R, Tejada de Hernández I. (1992): Digestibilidad aparente de la pulpa deshidratada de limón. Comparación de métodos para estimarla. *Técnica Pecuaria Mexicana*, 30(1):13 - 22.
- Bochi-Brum O, Carro MD, Valdés C, González JS, y López S. (1999): Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados: Efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Archivos de Zootecnia.*, 48: 51-61.
- Bruni MA, Chilbroste P. (2001): Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivos Latinoamericano Producción Animal*, 9(1): 43-51.
- Cañas R. (1995): Alimentación y Nutrición Animal. Colección en Agricultura Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Castro TF. Bermúdez Sanz AR. (1991): Efecto de la relación forraje: Concentrado de la ración sobre la digestibilidad de la materia seca y los componentes de la pared celular, *Archivos de Zootecnia.*, 40: 5-85.
- CEDEMUN. (1986): Centro Nacional de Desarrollo Municipal en Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/>(23de Agosto de 2015).

- Church DC. (1974): *Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes. Vol.1 Fisiología Digestiva*. Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- Fahey GC, Jung HG. (1983): Lignin as marker in digestion studies: A review. *J. Anim. Sci.* 57: 220 - 225.
- Giraldo LA, Gutiérrez LA, Rúa C. (2007): Comparación de dos técnicas *in vitro e in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, 20:269-279.
- González A, Arias LE, Yáñez A, González LA, Silva M, Vega MA, Larios R. (2012): Producción y calidad de forraje de siete variedades de avena en diferentes etapas de corte en el sur de Jalisco. En: Flores NM, Reveles TL, *et al* editores. Reunión Internacional Conjunta de Manejo de Pastizales y Producción Animal. Zacatecas, México: 131-135.
- Huntington JA, Givens DI. (1995): *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B).*, 65:65-93.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. (2009): Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Acapulco, México. Clave geoestadística 15003. Disponible en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15003.pdf> (Consultado, 12 de Agosto de 2015).
- Jones D, Hayward M. (1975): The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26:711-718.
- Kiraz. (2011): Determination of Relative Feed Value of Some Legume Hays Harvested at Flowering Stage, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (5):525-530.
- Kotb AR, Luckey TD. (1972): Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews.*, 42: 813 - 845.

- Lachmann M, y Araujo FO. (1999): La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Lascano C, Borel R, Quiroz R, Zorrilla J, Chaves C, Wernli C. (1990): Recomendaciones sobre metodología para la medición de consumo y digestibilidad *in vivo*. En: M. E. Ruiz y A. Ruiz (Eds.). Nutrición de Rumiantes: Guía metodológica de investigación. IICA-ALPA-RISPAL. San José, Costa Rica, 159-168.
- Mc Donald J. (1986): Nutrición Animal. 3 Ed. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- Mellado ZM, Matus TI, Madariaga BR. (2008): Antecedentes sobre el triticale en Chile y otros países. Boletín INIA No. 183. Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Mendoza-Elos M, Cortez-Baheza E, Rivera-Reyes JE, Rangel-Lucio JA, Andrión-Enríquez E, Cervantes-Ortiz F. (2011): Época y densidad de siembra en la producción y calidad de semilla de triticale (*X Triticosecale Wittmack*). *Agronomía Mesoamericana*, 22(2):309-316.
- Moreyra F, Giménez F, López JR, Tranier E, Real Ortellado M, Krüger H, Mayo A, Labarthe F. (2014): Verdeos de Invierno. 1ª ed., INTA, Buenos Aires.
- Murillo AB, Escobar HA, Fraga MH, Pargas LR. (2001): Rendimiento de grano y forraje de líneas de triticale y centeno en Baja California Sur, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(2):145-153.
- Núñez HG, Payan GJA, Pena RA, Gonzalez CF, Ruiz BO, Arzola AC. (2010): Caracterización agronómica y nutricional del forraje de variedades de especies anuales en la región norte de México; 1(2):85-98.
- Osorio CE, Giraldo CJ, Narváez SW. (2012): Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. Artículo de revisión de la Universidad de Caldas, 6(1):87-97.
- Pinos-Rodríguez JM, González MSS, Mendoza MGD, Bárcena GR, Cobos PM. (2002): Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la

- pared celular de heno de alfalfa (*medicago sativa*) o de ballico (*lolium perenne*). *Interciencia*, 27(1): 28-32.
- Ramirez OS. (2007): Efecto del sistema de siembra y estado de madurez sobre producción y calidad nutricional de siete variedades de avena (*avena sativa*). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih., México.
- Ramirez S, Dominguez D, Salmeon JJ, Villalobos G, Ortega JA. (2015): Contreo en surco y etapa de madurez sobre la producción y calidad del forraje de variedades de avena. *Archivos de Zootecnia*; 64 (247): 237-244.
- Relling AE, Mattioli GA. (2003): Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 5-15.
- Reyes MJC. (2015): Comparación de dos métodos *in vitro* para estimar la digestibilidad de forrajes de praderas cultivadas de sistemas de producción de leche en pequeña escala. Tesis de licenciatura, FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- Riveros E, Argamentarías A. (1987): Métodos Enzimáticos de Predicción de la digestibilidad In Vivo de la Materia Orgánica de Forrajes, En: Avances en Producción Animal, Vol. 12, Ed. Mario Silva G. 59-75, Chile.
- Rodríguez NM, Oliveira SSE, Guimaraes-Junior R. (2007): Uso de indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto. LIPE, lignina purificada y enriquecida. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 20 (4):518-525.
- Salcedo G. Martínez C, Barceló P, Lazzeri P, Martín A. (2014): Potencial productivo y nutritivo de los triticales de nueva generación. 53 Reunión científica de la SEEP.
- Scheffler W. (1979); *Statistics for the Biological Sciences*. 2ª ed., Addison Wesley, EEUU.
- Teuber KN, Balocchi LO, Parga MJ. (2007): Manejo del pastoreo., Imprenta América, Osorno, Chile, 123.

- Tilley JM, Terry RA. (1963): A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Brit. Grassland Soc.,18: 104-111.
- Tobal CF. (1999): Evaluación de los alimentos a través de los diferentes métodos de digestibilidad, Universidad de la Pampa., 94-126.
- Tobare B. (2015): Conceptos básicos sobre la calidad de los forrajes. Laboratorio NIRS – Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Lomas de Zamora.<http://www.buenastareas.com/ensayos/Valoracion-Nutricional-En-General-Veterinario/50974460.html>.(15 de junio 2015).
- Tomoso JC. (2009): Cereales forrajeros de invierno. Agromercado., 149:1-4.
- Torres GG, Arbaiza FC, Carcelen CF, Lucas AO. (2009): Comparación de las técnicas *in situ*, *in vitro* y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes en ovinos. Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú; 20 (1): 5-9.
- Van LE, Regueiro M. (2008): Digestión en retículo-rumen. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Van Soest PJ, Wine RH, Moore LA. (1996): Estimation of the true digestibility of forages by *in vitro* digestion of cell walls.Int.Grassl.Congr.10^a, Helsinki. P.438-441.
- Villalobos GC, González VE, Santos OJA. (2000): Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes de pastoreo. Técnica Pecuaria. México; 38 (2):119-134.
- Villareal H, Arias E, Sánchez A, Tovar R, Núñez G. (2012): Caracterización agronómica y nutricional del forraje de cereales de grano pequeño en los altos de Jalisco. En: Castellanos PE, Serrato CS, et al editores. Semana Internacional de Agronomía. Durango, México: 1397- 1401.
- Wattiaux MA, Terry HW. (2015): Digestión en la vaca lechera. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/babkoc/01_s.pdf. (22 de Julio 2015).