



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN KAFIRNAS-TANINOS SOBRE
LA DIGESTIBILIDAD EN CERDOS EN CRECIMIENTO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

LUIS HERNÁNDEZ CERVANTES

TUTOR: GERADO MARISCAL LANDÍN

COMITÉ TUTORAL:
HECTOR JIMENEZ SEVERIANO
MARCO ANTONIO HERRADORA LOZANO



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.

Dedicatorias

A mis papas, gracias por todo.

A Lilian, por ser la mejor pareja todo este tiempo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

Al Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Dr. Héctor Jiménez y al Dr. Marco A. Herradora, integrantes de mi comité académico.

A la Dra. Leticia Gracia, por su invaluable ayuda.

A Leticia Jiménez, por su apoyo.

A todos mis profesores del posgrado.

A mis sinodales.

A mis compañeros: Cristina, Flor, Isaac, Jonathan, Jorge, Yumi y especialmente a Oliva y Víctor por su interés y ayuda en mi trabajo.

A mi familia y a Lilian por su apoyo ilimitado.

Al Dr. Mariscal por su labor ejemplar como asesor y más aun por su calidad como persona, fundamental para lograr este trabajo.

IV. Resumen.

El sorgo se caracteriza por una baja digestibilidad de la proteína, atribuida a la presencia de taninos; sin embargo, éstos sólo la afectan cuando están presentes en gran cantidad. Estudios *in vitro* muestran que la digestibilidad de la proteína disminuye cuando se incrementan las kafirinas. El objetivo del trabajo fue evaluar *in vivo* si el contenido de kafirinas influye negativamente en los coeficientes de digestibilidad ileal (CDI) de la proteína de sorgo en cerdos en crecimiento. Para ello se produjeron tres híbridos de sorgos (bajo, medio y alto en taninos); la mitad de cada parcela se fertilizó con exceso de nitrógeno para incrementar el contenido de kafirinas, con la finalidad de obtener el mismo híbrido con un contenido alto y uno bajo en kafirinas. Se utilizaron 4 cerdos Duroc x Landrace con un peso de 60 kg por tratamiento, a los cuales se les colocó una cánula en el ileon terminal. Los siguientes análisis se realizaron en las dietas y en las digestas ileales: proteína cruda (PC), energía bruta (EB), cromo, taninos y perfil de proteínas; además, en las digestas se realizó un análisis de western blot. Se calculó la digestibilidad ileal aparente (DIA) y estandarizada (DIE) de la PC y materia seca (MS) del sorgo. Los resultados mostraron que el contenido de PC de los sorgos fue similar para los sorgos fertilizados normalmente o fertilizados con exceso de nitrógeno para cada híbrido. Sin embargo, en el sorgo bajo en taninos la relación entre las fracciones de kafirinas solubles en alcohol (kafirinas 1) y las solubles en alcohol más un agente reductor (kafirinas 2) fueron diferentes, siendo mayor la proporción de kafirinas 2 en el sorgo que fue fertilizado con exceso de nitrógeno. Los CDI mostraron una menor ($P < 0.05$) DIA y DIE de la PC del sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno. Estos resultados fueron congruentes con el western blot. La diferencia en digestibilidad ileal del sorgo bajo en taninos se debió a una mayor proporción de kafirinas 2 que está asociado a una mayor cantidad de enlaces disulfuro. El análisis en conjunto de los tres híbridos la digestibilidad ileal de la MS, EB, así como la DIA y DIE de la PC del sorgo con nivel alto en taninos fue menor a la de los sorgos con nivel medio y bajo de taninos. Los datos muestran la no interacción entre kafirinas y taninos sobre la digestibilidad ileal de energía y proteína.

Palabras claves: cerdos, sorgo, digestibilidad, taninos, kafirinas

V. Abstract

Sorghum is characterized by its low protein digestibility, attributed to the presence of tannins. However, protein digestibility is affected only when tannin concentration is high. In vivo studies show that protein digestibility decreases when kafirin concentration increases. The aim of this experiment was to assess the negative effect of kafirins on the ileal digestibility coefficient (IDC) of sorghum protein in growing pigs. Three sorghum hybrids (low, moderate and high in tannins) were cultivated, over-fertilizing with nitrogen half of the plot to obtain a single hybrid with different kafirin concentration. Four Duroc x Landrace pigs, weighing 60 kg and fitted with ileal cannulae, were used. The analyses run on the diets and the ileal digesta were: crude protein (PC), chromium concentration, tannin concentration and protein profile. The digesta was also analyzed with Western blot. Crude protein and dry matter (DM) apparent ileal (AID) and standardized (SID) digestibility were estimated. Result showed that CP concentration was similar in both normally – and over-fertilized sorghum hybrids. However, in the low-tannin hybrid, the concentration of type-2 kafirins was higher than that of type-1 kafirins. The high-kafirin hybrid showed a lower AID and SID ($P < 0.05$) than the low-tannin variety, results that were consistent with those of the Western blot. The difference in ileal digestibility was attributed to the higher concentration of disulfide bonds in the low-tannin hybrid.

Key words: pigs, sorghum, digestibility, tannins, kafirins.

Índice general	Página
• Dedicatorias	II.
• Agradecimientos	III.
• Resumen	IV.
• Abstract	V.
• Índice general	VI.
• Índice de cuadros	IX.
• Índice de figuras	XI.
I. Introducción	13.
II. Revisión bibliográfica	14.
2.1. Sorgo	14.
2.1.1. Estructura del grano de sorgo	14.
2.1.1.1. Pericarpio	14.
2.1.1.2. Testa	14.
2.1.1.3. Endospermo	15.
2.1.1.4. Germen	16.
2.1.2. Composición química	16.
2.1.2.1 Almidón	16.
2.1.2.2 Proteína	17.
2.1.2.3. Lípidos	17.
2.1.2.4. Fibra	18.

	Página
2.1.2.5. Minerales	18.
2.2. Digestibilidad	18.
2.2.1. Pérdidas de aminoácidos endógenos ileales	19.
2.2.2. Digestibilidad ileal aparente	20.
2.2.3. Digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos	21.
2.2.4. Digestibilidad ileal estandarizada de aminoácidos	22.
2.3. Taninos	22.
2.4. Kafirinas	24.
2.4.1. Efecto de las kafirinas en la digestibilidad proteica del sorgo	25.
2.4.2. Kafirinas y dureza del grano	27.
2.4.3. Efecto de las kafirinas en la digestibilidad del almidón sorgo	28.
III Justificación	29.
IV. Material y Métodos	30.
4.1. Animales	30.
4.2. Tratamientos	32.
4.3. Dietas	33.
4.4. Muestreo	35.
4.5. Análisis de laboratorio	35.
4.5.1. Obtención del perfil de proteínas de los sorgos	35.
4.5.2. Separación electroforética de las proteínas de sorgo	36.
4.5.3. Producción de un anticuerpo policlonal contra las kafirinas	37.
4.5.4. Western blot	39.
4.5.5 Análisis químicos	40.

	Página
4.5.6 Prueba de digestibilidad	40.
4.6. Análisis estadístico	40.
V Resultados	43.
5.1. Composición química	43.
5.2. Perfil de proteínas	43.
5.3. Prueba de digestibilidad	47.
5.4. Análisis de digestas por western blot	49.
VI Discusión	56.
6.1. Perfil de proteínas	56.
6.2. Prueba de digestibilidad	58.
6.3. Análisis de digestas por western blot	59.
VII Conclusiones	62.
7.1. Impacto del trabajo sobre el uso del sorgo en la alimentación del cerdo	63.
VIII Referencias	64.

Índice de cuadros.	Página
Cuadro 1. Concentración de aminoácidos en la proteína del sorgo.	17.
Cuadro 2. Clasificación de las kafirinas.	25.
Cuadro 3. Digestibilidad de sorgos <i>in vitro</i> .	26.
Cuadro 4. Composición porcentual de las dietas ocupadas en el experimento.	34.
Cuadro 5. Disolventes para la obtención de las fracciones proteínicas del sorgo.	36.
Cuadro 6. Grupos experimentales.	41.
Cuadro 7. Composición química de los sorgos ocupados en el experimento.	43.
Cuadro 8 Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones proteicas del sorgo con concentración baja de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	44.
Cuadro 9. Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones proteicas del sorgo con concentración media de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	44.
Cuadro 10. Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones proteínicas del sorgo con concentración alta de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	45.
Cuadro 11. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel bajo en taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	48.
Cuadro 12. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel medio de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	48.
Cuadro 13. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel alto de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	48.
Cuadro 14. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel bajo, medio y alto en taninos.	49.

Índice de figuras.	Página
Figura 1. Esquema de un cuerpo de proteína del sorgo.	13.
Figura 2. Esquema de grano de sorgo, corte transversal.	15.
Figura 3. Estructura molecular de la amilosa y de la amilopectina.	16.
Figura 4. Influencia de los aminoácidos dietarios sobre los valores de digestibilidad aparente estandarizada y verdadera de aminoácidos.	21.
Figura 5. Estructura de tanino hidrolizable y tanino condensado.	23.
Figura 6. Cánula simple en "T".	30.
Figura 7. Cerdo con anestesia inhalada.	31.
Figura 8. Presentación del ligamento ileocecal.	31.
Figura 9. Exteriorización de la cánula a través de la segunda incisión.	32.
Figura 10. Manejo para obtener los 6 tratamientos ocupados en el experimento.	33.
Figura 11. Cronograma de la prueba de digestibilidad.	35.
Figura 12. Secuencia para la obtención de fracciones proteínicas del sorgo.	36.
Figura 13. Emulsificación con adyuvante completo de Freund.	37.
Figura 14. Sangrado previo a la inmunización.	38.
Figura 15. Monitoreo de la respuesta inmune por medio de dot blot a los 15 y 21 días post-inoculación.	39.
Figura 16. Diseño cross-over.	41.
Figura 17. Porcentaje de kafirinas 1 (solubles en alcohol) y kafirinas 2 (solubles en alcohol + agente reductor) del sorgo con concentración baja de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.	45.
Figura 18. I Fotografía de gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS PAGE) 15% con fracciones proteicas del sorgo analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Pesos moleculares (kDa) de las fracciones proteicas del sorgo calculadas por el programa Kodak 1D a partir del marcador de peso molecular (MPM).	46.
Figura 19. I Fotografía del western blot de kafirinas y kafirinas ligadas analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Pesos moleculares	

Índice de figuras.	Página
(kDa) de kafirinas 1 y 2 de los sorgos, calculados por el programa Kodak 1D a partir del marcador de peso molecular (MPM).	47.
Figura 20. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo bajo en taninos con fertilización normal analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.	50.
Figura 21. IFotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo bajo en taninos fertilizados con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.	51.
Figura 22. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración media de taninos fertilizado normalmente analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.	52.
Figura 23. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración media de taninos con fertilizado con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.	53.
Figura 24. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración alta de taninos fertilizado normalmente analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.	54.
Figura 25. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración alta de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso	

Índice de figuras.	Página
molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.	55.
Figura 26. Fotografía western blot de kafirinas con peso molecular de 11.09 y 12.60 KDa.	56.
Figura 27. Interacción propuesta entre taninos y residuos de prolina.	58.
Figura 28. . Modelo de interacción entre proteínas y taninos.	59.

Introducción

El grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es la principal fuente de proteína y energía para millones de personas en África y Asia (Klopfenstein y Hosene, 1995). La popularidad del grano está dada por la posibilidad de producir cosechas razonables en zonas secas y con altas temperaturas. En México, se destina principalmente para la alimentación de animales (SAGARPA 2009); es un ingrediente tradicional en la alimentación de cerdos, el cual se combina para lograr aportes adecuados de energía y aminoácidos, donde el sorgo puede proveer de 30 a 60% del requerimiento total de aminoácidos en esta especie.

La calidad nutricional de la proteína del sorgo es pobre debido a su baja digestibilidad; el sorgo es único entre los cereales cultivados en producir grandes cantidades de compuestos fenólicos (taninos). Se ha observado que la digestibilidad de aminoácidos y el contenido de energía metabolizable varían inversamente al contenido de taninos (Douglas et al., 1990); sin embargo, con sorgos bajos en taninos o libres de taninos la baja digestibilidad proteínica aún existe (Elkin et al., 1996). Estudios *in vitro* sugieren que las kafirinas (prolaminas del sorgo) son las principales responsables de la baja digestibilidad del grano del sorgo (Hamaker et al., 1986).

Las kafirinas comprenden 70-80% de la proteína en el grano, haciéndolas el almacén más abundante (Hicks et al., 2001). Estas proteínas pueden ser subclasificadas en: α , β y γ ; el tipo α es el más abundante (80%), seguido por γ (15%) y β (5%). Las kafirinas son sintetizadas y trasladadas al lumen del retículo endoplásmico, donde se agrupan en cuerpos esféricos de proteína (Taylor et al., 1985).

Imágenes de microscopía electrónica muestran que la γ kafirina y en menor proporción la β kafirina, encapsulan a la α kafirina la más abundante y digestible por polímeros unidos por puentes disulfuro (Shull et al., 1992), lo cual impide su exposición a las proteasas (Figura 1). El objetivo del trabajo fue evaluar *in vivo* si la interacción kafirinas-taninos influye en los coeficientes de digestibilidad ileal de la proteína en cerdos en crecimiento.

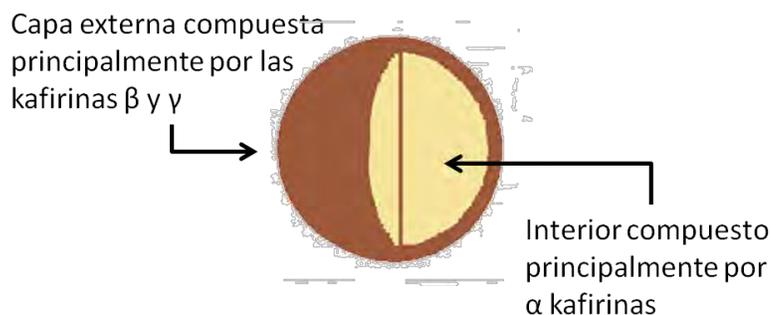


Figura 1. Esquema de un cuerpo de proteína del sorgo.

II Revisión bibliográfica

2.1. Sorgo

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] pertenece a la familia *Poaceae*, de la tribu *Andropogoneae*, del género *Sorghum* y de la especie *bicolor*. Es una planta diploide con $2n=20$ cromosomas. Es uno de los cultivos más resistentes a sequías y de igual forma al ataque de insectos, pájaros y hongos (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). El sorgo se originó en África hace 3000 a 5000 años y ahora está extendido a través del mundo (Belton y Taylor, 2002); ocupa el quinto lugar de producción de cereales en el mundo después de la cebada, arroz, trigo y maíz (USDA., 2009). México es el cuarto productor después de los Estados Unidos, Nigeria e India y es el segundo cereal más producido en el país después del maíz (USDA, 2009). En México se utiliza principalmente para alimentar animales (SAGARPA, 2009).

2.1.1. Estructura del grano de sorgo.

El grano es generalmente de forma esférica, mide 4 mm de largo, 2 mm de ancho y 2.5 mm de grosor; el peso del grano, peso volumétrico y densidad se encuentran en el rango de 25-35 mg, 708-760 kg/m³ y 1.26-1.38 g/cm³, respectivamente (Serna-Saldivar y Rooney, 1995); el grano de sorgo está constituido de tres partes, llamadas pericarpio, endospermo y germen (figura 2).

La proporción relativa de estos componentes varía entre el tipo de sorgo. La variación está influida por factores genéticos y ambientales; sin embargo, en promedio estos componentes constituyen alrededor de 6%, 84% y 10% del grano del sorgo, respectivamente (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

2.1.1.1. Pericarpio

Es la cobertura externa del grano que está adherida fuertemente al endospermo y se caracteriza por tres capas principales: el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio. El epicarpio la capa más externa está revestida generalmente por cera que contiene pigmentos, que determinan el color del grano (Earp et al., 2004).

2.1.1.2. Testa

Es otro componente del grano (puede estar presente o no); el tejido de la testa está localizado debajo del endocarpio puede estar pigmentado. En el sorgo la pigmentación de esta capa está genéticamente controlada por los genes B1-B2 y es indicativa de la presencia de taninos condensados o proantociandinas (Earp et al., 2004).

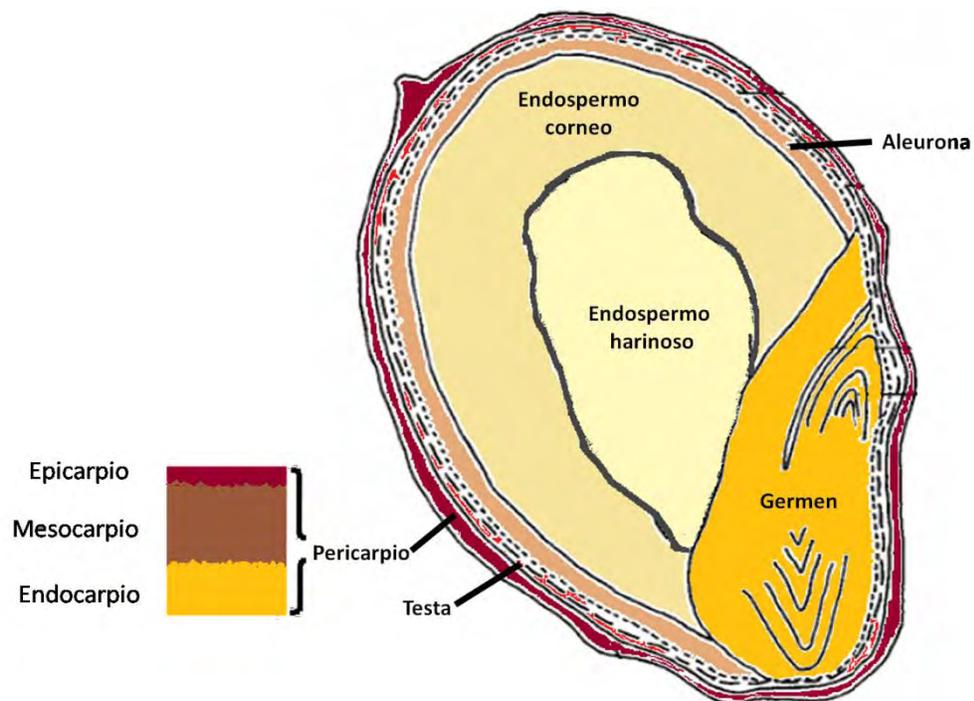


Figura 2. Esquema de grano de sorgo, corte transversal. Adaptado de Rooney y Miller (1982)

2.1.1.3. Endospermo

El endospermo es el tejido del grano rico en almidón, consiste principalmente de la porción córnea (externa) y la harinosa (central). Se separa del pericarpio y de la testa, si ésta está presente por una capa sencilla de células rectangulares llamada aleurona, que forma también parte del endospermo. El endospermo córneo contiene cuerpos de proteína que existen en una continua interfase con gránulos de almidón. Este arreglo estructural es compacto y da al endospermo córneo su apariencia traslúcida; el endospermo harinoso o endospermo suave también contiene cuerpos de proteína y gránulos de almidón, pero en comparación al endospermo vítreo, el arreglo es menos compacto, con espacios vacíos, lo que le da una apariencia opaca (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

Existe un gradiente de cuerpos de proteína y gránulos de almidón de la periferia al centro del endospermo, donde la concentración de gránulos de almidón se incrementa hacia el centro, mientras que la cantidad de cuerpos de proteína disminuye (Rooney y Miller, 1982). Los gránulos de almidón son esféricos en el endospermo harinoso, pero pequeños y poligonales en el endospermo vítreo. La proporción relativa entre el endospermo vítreo y el harinoso varía entre los tipos de sorgo y está influida por la genética y factores ambientales (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

2.1.1.4. Germen

Consiste en el eje embrionario (radícula y plúmula) y el escutelom; el germen es rico en lípidos, proteína y minerales (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

2.1.2. Composición química

2.1.2.1 Almidón

El almidón es el mayor componente del grano (75-79%). Como en otros cereales, el almidón del sorgo contiene dos tipos de moléculas que se encuentran almacenadas en los gránulos: amilosa, que es un polímero lineal y amilopectina, que es un polímero altamente ramificado (Figura 3). Estas moléculas representan aproximadamente 22-30% y 70% respectivamente del almidón (Serna-Saldivar y Rooney 1995). Los sorgos cerosos contienen una pequeña cantidad (aproximadamente 5 %) o no contienen amilosa (Serna-Saldivar y Rooney 1995).

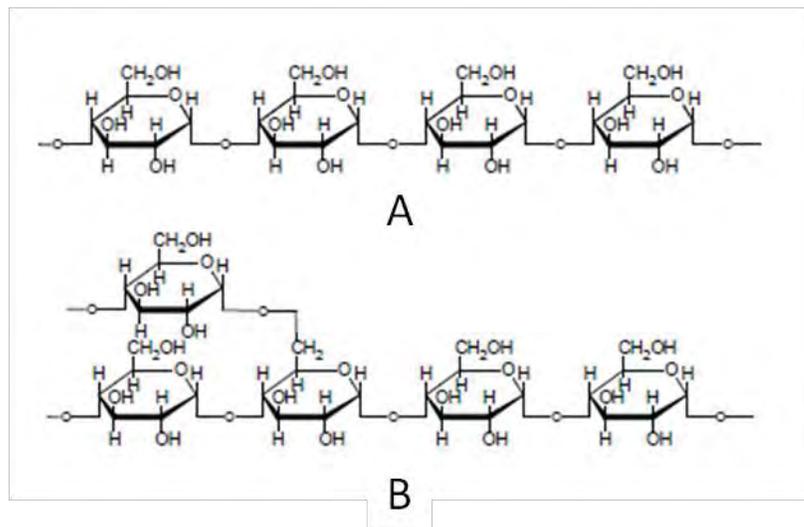


Figura 3.(A).- Amilosa, molécula lineal compuesta por D-glucosas con enlaces α 1,4 (B).- Amilopectina, polímero con enlaces α 1,4 y puntos de ramificación con enlaces α 1,6.

Típicamente la amilosa tiene una estructura helicoidal hecha por residuos de glucosa unidos por enlaces α 1,4, mientras que la amilopectina consiste en cadenas lineales cortas con enlaces α 1,4 y ramificadas con enlaces α 1,6. Cagampang and Kierls (1984) señalan que el contenido de amilosa está correlacionado positivamente con la dureza del endospermo.

2.1.2.2 Proteína

La proteína es el segundo mayor componente del sorgo, con una gran variación, entre 5.2 y 12 % del grano (Serna-Saldivar y Rooney 1995; Ramírez et al., 2005). Tiene un bajo contenido de lisina con relación al maíz (Ward y Southern, 1995). La composición de los aminoácidos del sorgo se muestra en cuadro 1. Taylor y Schüssler (1986) indican que aproximadamente 80, 16, y 3% del total de la proteína del sorgo se encuentra en el endospermo, germen y pericarpio, respectivamente.

Aminoácido	% Aminoácidos en proteína cruda		
	Valor medio	Min.	Max.
Met	0.17	0.12	0.24
Cis	0.17	0.12	0.23
Lis	0.22	0.16	0.29
Tre	0.31	0.23	0.42
Trp	0.10	0.08	0.15
Arg	0.38	0.29	0.49
Ile	0.37	0.24	0.52
Leu	1.21	0.79	1.77
Val	0.46	0.32	0.64
His	0.23	0.16	0.30
Fen	0.49	0.30	0.74
Tir	0.35	0.23	0.49
Gli	0.32	0.24	0.46
Ser	0.42	0.28	0.58
Pro	0.77	0.51	1.12
Ala	0.82	0.54	1.21
Asp	0.67	0.48	0.94
Glu	1.84	1.22	2.73

Cuadro 1.- Concentración de aminoácidos en la proteína del sorgo. Todos los valores se obtuvieron a partir de un tamaño de muestra n=115 a excepción de Trp(n=80), His(n=90), Fen(n=91) Tir (n=32). Adaptado de AminoDat 1.0.

2.1.2.3. Lípidos

El grano de sorgo contiene 2.5-5.0% de aceite (Hoseney, 1994), encontrándose 76%, 13% y 11% del total en el germen, endospermo y pericarpio, respectivamente (Serna-Saldivar y Rooney ,1995). El sorgo contiene lípidos polares, no polares y lípidos no saponificables (no sufren hidrólisis

alcalina). Los lípidos no polares o neutrales son los más abundantes, representando alrededor de 93% del contenido total de lípidos (Serna-Saldivar y Rooney, 1995), en la composición de ácidos grasos domina los ácidos grasos linoleico, oleico y palmítico, representando 49%, 31% y 14%, respectivamente, del total de ácidos grasos (Osman et al., 2000). Su estructura molecular insaturada los hace propensos a la oxidación (Eskin y Przybylski, 2001).

2.1.2.4. Fibra

La fibra del sorgo se encuentra en el pericarpio y en las paredes celulares del endospermo y consiste principalmente de celulosa (FAO, 1999) y glucuronarabinosanos respectivamente (Verbruggen, 1993). También contiene β -glucanos, lignina, pectinas y gomas (Hoseney, 1994). El grano contiene 3.7 a 7.9% de fibra insoluble y 1.1 al 1.23% de fibra soluble (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

2.1.2.5. Minerales

El contenido mineral del sorgo es altamente variable, dependiendo del medio y de la genética (FAO, 1999). Los minerales se concentran en el pericarpio, el germen y la aleurona (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). La cenizas representan en promedio 1.47 % del grano (INRA-AFZ). Y están compuestas principalmente de sales de fósforo y de calcio. El ácido fítico se encuentra en el germen y en la aleurona (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

2.2. Digestibilidad

El uso efectivo de las materias primas requiere conocer su valor nutritivo, el cual corresponde a su aporte de nutrientes al organismo, por lo que se requiere conocer, además de la composición química, su digestibilidad.

La digestibilidad puede determinarse a nivel fecal o a nivel ileal; la primera es importante para energía y minerales y la segunda, para aminoácidos, ya que los aminoácidos se absorben solo en el intestino delgado (Sauer y Ozimek, 1986).

Las mediciones de digestibilidad de aminoácidos se basan en la desaparición de aminoácidos del tracto digestivo; sin embargo, estas mediciones no indican la degradación neta o síntesis de aminoácidos en el lumen intestinal o la forma en que los aminoácidos se absorben. Esto es: la fermentación microbiana en el lumen del intestino delgado contribuye a la degradación o síntesis neta de aminoácidos y, por ejemplo, cuando las materias primas son tratadas con calor, algunos aminoácidos, como la lisina, se presentan en diferentes formas químicas como productos de la reacción de Maillard. Estos productos que pueden ser absorbidos, pero no son utilizados para la síntesis de proteína (Moughan y Rutherford, 1996); así, la digestibilidad calculada sobrestima la disponibilidad de los aminoácidos.

La digestibilidad de los aminoácidos refleja la hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana de las proteínas y péptidos consumidos y la absorción de aminoácidos y péptidos del lumen gastrointestinal. Los procesos de digestión, fermentación y absorción involucran nutrientes que son de origen dietario o de secreciones endógenas en el tracto gastrointestinal (Fuller, 2003). Así, la digestibilidad es usada como un indicador de la disponibilidad de aminoácidos; es, esencialmente, una medición de la susceptibilidad de la proteína a la hidrólisis. Una proteína con una alta digestibilidad es potencialmente más nutritiva que una proteína con baja digestibilidad porque puede proveer de más aminoácidos para su absorción (Duodu et al., 2003).

Para la determinación de los coeficientes de digestibilidad ileal hay varios procedimientos quirúrgicos posibles, que permiten la recolección rutinaria de muestras en los cerdos. Entre éstos se encuentran las técnicas de fistulación e implantación de una cánula simple en "T", re entrante, post valvular íleo – cólica y en "T" post valvular cecal (Nissen, 1992) y las técnicas de anastomosis íleo – rectal (Bengala et al., 1988). La más comúnmente usada es la fistulación e implantación de una cánula simple en "T", debido a que es el procedimiento menos invasivo y no involucra la remoción de segmentos del intestino grueso (Reis de Souza et al., 2000); sin embargo a diferencia de la anastomosis ileo-rectal, que permite la recolección completa de la digesta ileal, solo puede recolectarse una porción de digesta. Por lo tanto es necesaria la inclusión de un marcador indigestible en la dieta. El sesquióxido de cromo y el dióxido de titanio son los dos marcadores más comunmente usados (Stein et al., 2007).

2.2.1. Pérdidas de aminoácidos endógenos ileales.

Los valores de digestibilidad de los aminoácidos pueden ser expresados como aparentes, estandarizados o verdaderos, dependiendo de cómo se considere la pérdida de aminoácidos endógenos en la medición de digestibilidad (Stein et al., 2007).

Las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales representan los aminoácidos que están presentes en las proteínas que son sintetizadas endógenamente, son secretadas al lumen intestinal del cerdo y que no son digeridas y reabsorbidas antes de alcanzar la parte distal del íleon. Mucoproteínas, células descamadas, albúmina sérica, enzimas digestivas, amidas y pelo ingerido contribuyen a las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales (Nyachoti et al., 1997). Aunque estrictamente no es proteína endógena, la proteína bacteriana también se incluye en la medición de proteína endógena ileal.

Las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales pueden dividirse en dos componentes principales, las pérdidas basales y las específicas (Sève y Henry, 1996; Nyachoti et al., 1997; Jansman et al., 2002). La pérdida basal, anteriormente referida como pérdida no específica o pérdidas independientes de la dieta, representa las cantidades mínimas de aminoácidos que el animal inevitablemente pierde. Estas pérdidas se atribuyen al funcionamiento normal del tracto gastrointestinal. Las pérdidas basales se expresan en proporción de la materia seca ingerida (Jansman et al., 2002).

Las pérdidas endógenas específicas, están influidas por la composición de los ingredientes en la dieta, como contenido y tipo de fibra y factores antinutricionales (Schulze et al.,1995). Cuando se alimenta con proteínas purificadas (caseína o proteína de huevo), las cuales son altamente digestibles, las pérdidas endógenas específicas son mínimas; en contraste, si se alimenta con ingredientes con fibra o factores antinutricionales, las pérdidas específicas pueden contribuir con más del 50% del total de las pérdidas de aminoácidos endógenos a nivel ileal (Souffrant, 1991; Moughan, 2003).

Los métodos convencionales para cuantificar las pérdidas de aminoácidos endógenos basales incluyen: a) alimentación con una dieta libre de proteína; b) alimentación con una proteína purificada altamente digestible; c) la técnica de alimentación péptidica y d) la técnica de regresión (Stein et al, 2007). No hay procedimientos de rutina disponibles para determinar las pérdidas específicas en cerdos; sin embargo, es posible calcularlas estimando el total de pérdidas endógenas de aminoácidos (pérdidas específicas más basales) y después restar las pérdidas basales. Los procedimientos usados para estimar el total de pérdidas endógenas de animales incluye a la técnica de homoarginina (Hagemeister y Ebersdobler, 1985; Rutherford y Moughan, 1990) y la técnica de dilución isotópica (Krawielitzki et al., 1977; Simon et al., 1987; de Lange et al., 1990).

2.2.2. Digestibilidad ileal aparente.

La digestibilidad ileal aparente (DIA) de aminoácidos se define como la desaparición de los aminoácidos ingeridos del tracto digestivo proximal al ileon distal. Los valores para DIA se calculan de acuerdo con la ecuación [1]:

$$\text{DIA, \%} = \frac{(\text{aminoácidos consumidos} - \text{aminoácidos excretados a nivel ileal})}{\text{aminoácidos consumidos}} \times 100 \quad [1]$$

La palabra aparente se usa para enfatizar que los aminoácidos dietarios no digeridos y los aminoácidos de origen endógeno, que son secretados en el tracto gastrointestinal y no son reabsorbidos, contribuyen al total de la excreción ileal de aminoácidos. Si se ocupan marcadores para calcular valores de digestibilidad, las concentraciones del marcador en el alimento y la digesta son usados para calcular la DIA de acuerdo con la ecuación. [2]:

$$\text{DIA, \%} = \left[\frac{\text{aminoácidos digesta}}{\text{aminoácidos dieta}} \times \left(\frac{M \text{ dieta}}{M \text{ digesta}} \right) \right] \times 100 \quad [2]$$

Donde, los aminoácidos digesta y aminoácidos dieta representan la concentración de aminoácidos en g/kg de MS en la digesta y la dieta, respectivamente, y M dieta y M digesta representa las concentraciones del marcador en g/kg de MS en la dieta y la digesta, respectivamente. La DIA carece de aditividad en la formulación de dietas con mezcla de ingredientes. Esto se atribuye en gran parte, al efecto del nivel de aminoácidos dietarios en los valores de DIA (Furuya y Kaji, 1991;

Donkoh y Moughan, 1994; Fan et al., 1994; Figura 4) y a la relativa contribución de los aminoácidos endógenos al total de aminoácidos en la excreción ileal.

2.2.3. Digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos

La digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos (DIV) refleja la proporción de aminoácidos dietarios que desaparece del tracto digestivo proximal al íleon distal. En este caso, únicamente los aminoácidos dietarios no digeridos, y no las pérdidas de aminoácidos endógenos ileales son relacionados con los aminoácidos consumidos. La DIV se calcula de la misma forma que la DIA con la excepción de que el total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales se resta de la excreción ileal total de aminoácidos, de acuerdo con la ecuación [3]:

$$\text{DIV, \%} = \{[\text{aminoácidos consumidos} - (\text{excreción ileal de aminoácidos} - \text{total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales})] / \text{aminoácidos consumidos}\} \times 100 \quad [3]$$

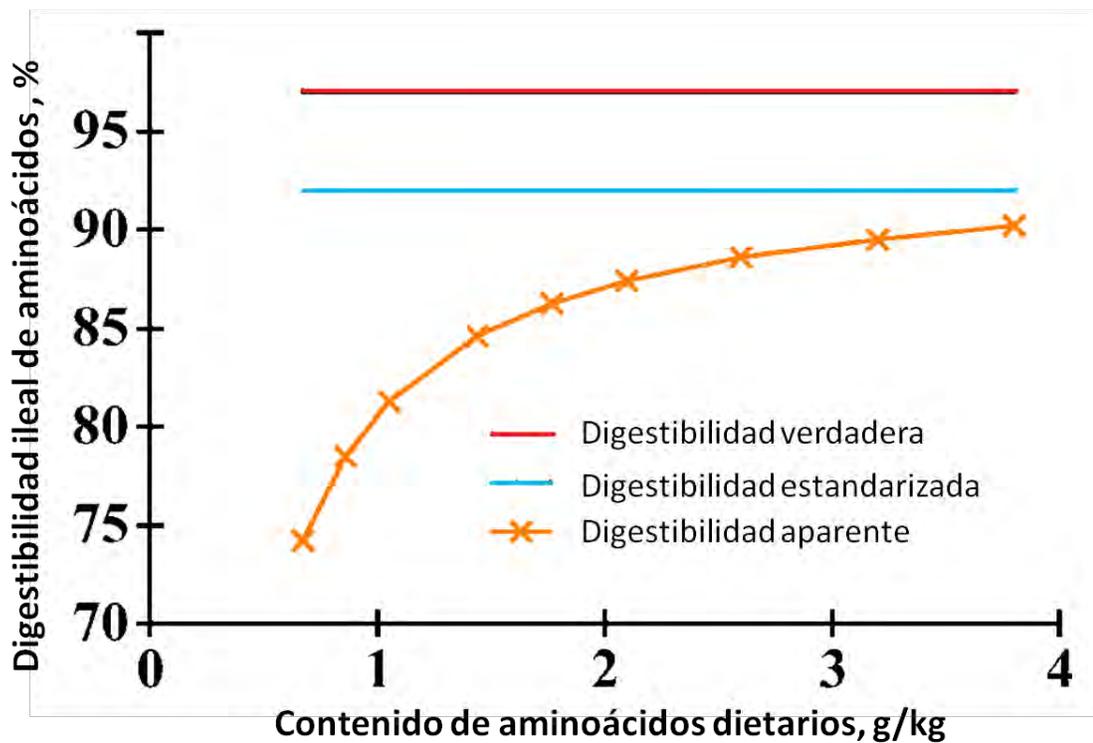


Figura 4. Influencia de los aminoácidos dietarios sobre los valores de digestibilidad aparente estandarizada y verdadera de aminoácidos. (Adaptado de Krawielitzki et al. (1977) y Fan et al. (1994).

Si la DIA de aminoácidos ya se ha calculado, la DIV se puede estimar más fácilmente de acuerdo con la ecuación [4].

$$\text{DIV, \%} = \text{DIA} + \left[\frac{\text{total de pérdidas de aminoácidos endógenos ileales/ aminoácidos en la dieta}}{100} \right] \times 100 \quad [4]$$

2.2.4. Digestibilidad ileal estandarizada de aminoácidos

Como una alternativa a la DIV, puede calcularse la digestibilidad ileal estandarizada de aminoácidos (DIS) (Jondreville et al., 1995; Mosenthin et al., 2000; Jansman et al., 2002), usando las pérdidas de aminoácidos endógenos basales, que se restan a la excreción ileal de aminoácidos, de acuerdo con la ecuación [5]:

$$\text{DIS, \%} = \left\{ \frac{\text{aminoácidos consumidos} - (\text{excreción ileal de aminoácidos} - \text{las pérdidas de aminoácidos endógenos basales})}{\text{aminoácidos consumidos}} \right\} \times 100 \quad [5]$$

Si los valores de DIA ya se han calculado, entonces DIS puede estimarse de acuerdo con la ecuación [6]:

$$\text{DIS, \%} = \text{DIA} + \left[\frac{\text{pérdidas de aminoácidos endógenos basales}}{\text{aminoácidos en la dieta}} \times 100 \right] \quad [6]$$

La principal ventaja para usar DIS en comparación con DIA y DIV, es su mayor aditividad en dietas mixtas (Stein et al., 2005).

2.3. Taninos

El término tanino proviene de la antigua palabra celta que se usaba para nombrar al roble, fuente típica de taninos, y hace referencia a la tecnología tradicional "Tanning" que se usa en el proceso de transformar la piel de los animales en cuero usando extractos de plantas de diferentes especies.

Los taninos son un grupo de metabolitos fenólicos, con pesos moleculares entre 500 y 30000 Da, que están ampliamente distribuidos en las plantas. El sorgo, es único entre los cereales cultivados por producir grandes cantidades de compuestos fenólicos (Elkin et al., 1996), con una amplia variedad de efectos biológicos. Se ha observado que la digestibilidad de aminoácidos y el contenido de energía metabolizable varían inversamente al contenido de taninos (Rostagno et al., 1973; Nelson et al., 1975; Kirby et al., 1983; Mitaru et al., 1983, 1985; Banda-Nyirenda et al., 1987; Douglas et al., 1990).

Los taninos se pueden clasificar en taninos condensados y taninos hidrolizables, que son los dos principales grupos de estos compuestos bioactivos. Los taninos condensados son polímeros de flavonoides y los taninos hidrolizables son polímeros de ácido gálico esterificado a una molécula comúnmente de glucosa o de un polifenol, como una catequina (Figura 5). Los taninos forman complejos tanino-proteína indigestibles, que involucran uniones de hidrógeno y asociaciones

hidrofóbicas no polares (Butler et al., 1984). En la formación del complejo los taninos modifican la conformación de la proteína y limitan o evitan el acceso de las enzimas; posterior a la formación del complejo, este puede precipitarse debido al gran tamaño de los taninos. Sin embargo esta precipitación puede no ser la causa de la reducción en la digestibilidad, ya que la desnaturalización de la proteína (en ocasiones caracterizada por la precipitación de la proteína) mejora la digestión proteica (Duodu et al., 2003).

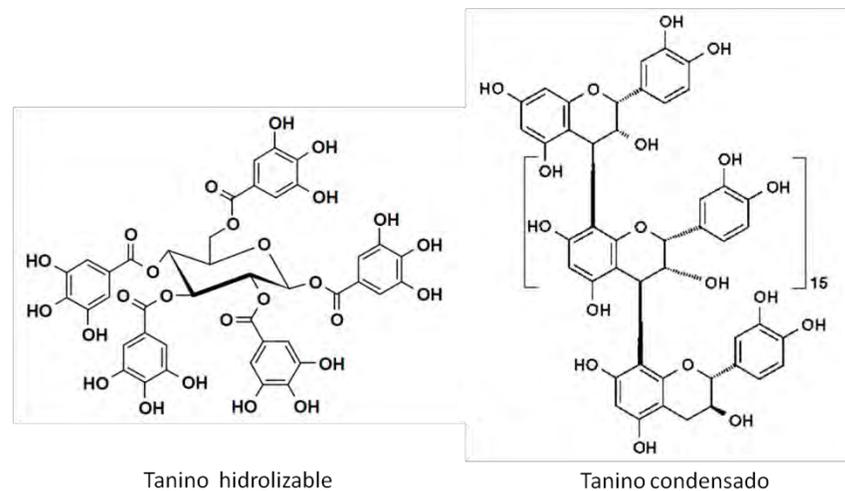


Figura 5. Estructura de tanino hidrolizable y tanino condensado (Adaptado de Hagerman, 2002).

Los taninos también son capaces de inhibir la actividad enzimática total o específica a nivel del duodeno de tripsina (Horigome et al., 1988; Al-Mamary et al., 2001), amilasa (Horigome et al., 1988; Al-Mamary et al., 2001) y lipasa (Al-Mamary et al., 2001); a nivel de yeyuno, de tripsina, amilasa y lipasa (Horigome et al., 1988), y a nivel de íleon de, tripsina (Horigome et al., 1988; Jansman et al., 1994) y amilasa (Horigome et al., 1988). La baja digestibilidad ileal de la proteína del sorgo puede afectar la digestibilidad ileal del almidón, ya que la proteína funciona como barrera que evita la gelatinización del almidón (Chandrashekar y Kirleis, 1988), lo que afecta negativamente su digestión. Los flavonoides no tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas (Emmambux y Taylor, 2003) y aunque los ácidos fenólicos si la tienen, no se ha encontrado evidencia de que reduzcan su digestibilidad (Duodu et al., 2003).

Se considera que los taninos participan en la defensa de las plantas, porque hacen a sus tejidos inapetecibles no nutritivos e inaceptables como fuente de alimento (Nahrstedt 1989). Ante la presencia de taninos en la dieta, la primera línea de defensa es la secreción en la saliva de una proteína ácida rica en prolina (PRP) (Jansman, 1993), la cual contiene 40% de prolina y 20% de glicina (Mehansho et al., 1985), y que puede llegar a representar 70% de la proteína total de la saliva; debido a que los taninos tienen una particular preferencia por unirse al aminoácido prolina (Hagerman y Butler, 1981; Mitaru et al., 1984; Charlton et al., 2002). Se explica la baja digestibilidad de la prolina y la glicina, lo cual se observa en sorgos altos en taninos, incluso

llegándose a obtener una digestibilidad ileal aparente negativa en el caso de prolina (Mariscal-Landín et al., 2004). Los efectos biológicos dependen del grado de polimerización y solubilización.

2.4. Kafirinas

Las proteínas del sorgo se clasifican con base en su solubilidad en diferentes disolventes en: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal), kafirinas 1 (solubles en alcohol), kafirinas 2 (alcohol + un agente soluble reductor) y glutelinas (detergente + agente reductor en un pH alcalino) y un residuo de proteína estructural no extraíble (Landry y Moureaux, 1970; Jambunathan y Mertz., 1973).

Las kafirinas (prolaminas del sorgo) comprenden 70-80% de la proteína en el grano, haciéndolas el almacén más abundante. Su contenido depende de factores genéticos y agronómicos (Hicks et al., 2001), siendo particularmente sensibles a la disponibilidad de nitrógeno (Banda-Nyirenda et al., 1987). Las kafirinas son sintetizadas y traslocadas al lumen del retículo endoplásmico donde se forman los cuerpos de proteína (Taylor et al., 1985). Son deficientes en lisina, treonina y triptófano y ricas en leucina, prolina y ácido glutámico (Shewry et al., 1995; Duodu et al., 2003).

Las kafirinas pueden subclasificarse en α , β y γ con base en su peso molecular, extractibilidad, estructura y reacciones cruzadas contra anticuerpos de zeínas (Cuadro 2) (Shull et al., 1991; Mazhar et al., 1995; Belton et al., 2006). Las kafirinas el tipo α son el principal almacén de proteína, abarcando 80% del total de las kafirinas le siguen las kafirinas γ (15%) y las β (5%). Recientemente se dilucidó la secuencia de DNA para la δ -kafirina que tiene una alta homología con la δ -zeína excepto por una región rica en metionina (Izquierdo y Godwin, 2005; Belton et al., 2006).

Cuadro 2. Clasificación de las kafirinas.

Tipo Kafirina	% Total	Peso molecular	No. De residuos de aminoácidos	Composición de aminoácidos	Comportamiento de polimerización	Disolvente de extracción
α	80	23 y 25	240-250	Rica en aminoácidos no polares, no Lys, un trp, 10 bloques de aminoácidos repetidos	Monómeros, Oligómero y polímeros.	50-90% terbutanol
β	7-9	12 y 15	172	Rico en Met y Cys, dos Trp	Monómeros y polímeros	30-80% terbutanol
γ	9-12	28.3	193	Ricos en Pro, Cys, His. No Lys, Asn, Asp, Trp. Cuatro repeticiones (consenso PPPVHL)	Oligómeros y polímeros	Agua + agente reductor o terbutanol + agente reductor
δ		12.9	114	Rica en Met, no Lys y un Trp		

Basado en El Nour et al. (1988), de Barros et al. (1991), Shull et al. (1991), Leite et al. (1999) y Chamba et al. (2005)

2.4.1. Efecto de las kafirinas en la digestibilidad proteica del sorgo

Un estudio realizado en Latinoamérica, en humanos, con cereales cocinados mostró una digestibilidad aparente de la proteína del sorgo de solo 46%, mientras que valores de 81, 73 y 66% se observaron con trigo, maíz y arroz, respectivamente (MacLean et al., 1981). Estudios *in vitro* (Axtell et al., 1981) confirmaron que en el sorgo cocinado, la digestibilidad disminuía sustancialmente; posteriormente, un estudio de digestibilidad *in vitro* con el uso de 2-mercaptoetanol incrementó la digestibilidad significativamente (Cuadro 3), casi al nivel de otros cereales. Se observó que al cocer el sorgo en presencia de 2-mercaptoetanol se incrementaba la digestibilidad proteica 25%, mientras que el incremento para el maíz con el mismo tratamiento era solo de 5 % y en la cebada, el arroz y el trigo ese tratamiento no tenía un efecto significativo (Hamaker et al., 1986).

El aumento mejora en la digestibilidad ocurría también en el sorgo sin cocinar, lo cual permitió postular que la adición de agentes reductores rompían los puentes disulfuro formados por cisteína, lo que impedía la acción enzimática, y que estos se incrementaban con la cocción

(Hamaker et al., 1987). Algunos resultados muestran que el sorgo es más rico en las kafirinas solubles en alcohol más un agente reductor que en las kafirinas que son solubles sólo en alcohol (Hamaker et al., 1986; Jambunathan y Mertz, 1973; Guiragossian et al., 1978; Vivas et al., 1992; Hamaker et al., 1995), lo cual es opuesto al caso de las zeínas (prolaminas del maíz). Emmambux y Taylor (2009) mostraron en un gel de poliacrilamida que las kafirinas polimerizan más que las zeínas cuando los granos son cocinados, es decir son más abundantes las zeínas solubles solo en alcohol (Hamaker et al., 1986, 1995; Vivas et al., 1992; Landry y Moureaux, 1980). La cocción del sorgo hace menos solubles a las kafirinas y se incrementan en proporción las solubles en alcohol más un agente reductor (Hamaker et al., 1986), lo cual sugiere una potencial relación entre solubilidad de las kafirinas y su digestibilidad. Algunos resultados muestran que las kafirinas son las últimas proteínas en ser digeridas *in vitro*. (Hamaker et al., 1986; Bach Knudsen y Munck, 1985; Duodu et al., 2002).

En imágenes de escaneo de microscopía electrónica de los cuerpos de proteína tras la digestión *in vitro* con pepsina, se observaron amplias perforaciones en los cuerpos de las proteínas del sorgo no cocido, mientras que los cuerpos de proteínas de sorgo cocinado continuaban lisas en apariencia, por lo que su digestión fue más larga (Rom et al., 1992). Estudios inmunocitoquímicos con el uso de anticuerpos policlonales de conejo contra las kafirinas α , β y γ mostraron una diferente ubicación de estas en el cuerpo de la proteína (Shull et al., 1992). Imágenes de microscopía electrónica de la estructura interna del cuerpo de la proteína muestran que la γ kafirina y, en menor proporción, la β kafirina encapsulan a la α kafirina (la más abundante y digestible) por medio de polímeros unidos por puentes disulfuro, lo cual impide su exposición a las proteasas. Ya que las kafirinas β y γ contienen cantidades significativas de cisteína (5 y 7 mol%, respectivamente) (Shull et al., 1992). Cocinar reduce la digestibilidad por efecto de un cambio conformacional en las proteínas, lo que puede facilitar la formación de puentes disulfuro. (Axtell et al., 1981; Hamaker et al., 1987; Oria et al., 1995; Duodu et al., 2002, 2003).

Cuadro 3. Digestibilidad de sorgos *in vitro*.

Grano	Tratamiento	Digestibilidad <i>in vitro</i>
Sorgo libre de taninos*	Sin cocinar	88.6–93.0
	Cocinado	45.3–56.7
Sorgo libre de taninos**	Sin cocinar	80.7
	Cocinado	64.8
Sorgo libre de taninos***	Sin cocinar	79
	Cocinado	58
	Sin cocinar + AR	96
	Cocinado + AR	79

*Axtell et al., 1981; **Hamaker et al., 1986; *** Rom et al., 1992

AR =Agente reductor.

Oria et al. (2000) encontraron una alta digestibilidad proteica *in vitro* en un sorgo mutante cocinado y sin cocinar; las microfotografías de microscopio electrónico de transmisión revelaron que los cuerpos de proteína tenían un microestructura única, de forma irregular y con numerosas invaginaciones, que frecuentemente alcanzaban el área central del cuerpo de la proteína, mientras que en el sorgo de un cultivo normal con una digestibilidad 2.5 veces más lenta, el cuerpo de la proteína era esférico y no contenía invaginaciones. Los resultados de inmunohistoquímica mostraron una localización relativa de las kafirinas α y β similar en los cuerpos de proteína del sorgo mutante y del normal, sin embargo, la γ kafirina se concentraba en la base de los dobleces en lugar de la periferia del cuerpo de la proteína, como es típico en los cultivos normales, lo que indicaba la no formación de puentes disulfuro en la periferia. Así, existía una mayor accesibilidad de las enzimas digestivas a la α kafirina, el principal almacén de proteína, además de que se incrementa el área de superficie.

El descubrimiento de este cultivo de sorgo con alta digestibilidad proteica *in vitro*, que podía ser comparable o superior a la de otros cereales ofrecía una alternativa o complemento para la dieta de cerdos y aves Elkin et al (2002) evaluaron el sorgo descrito por Oria et al (2000) en pollos de engorda, con la hipótesis de que el sorgo mutante altamente digestible sería capaz de permitir el desarrollo de pollos de engorda igual que el maíz y de otros sorgos a niveles óptimos de PC en la dieta. Sin embargo, pese a encontrar una elevada digestibilidad ileal verdadera de aminoácidos en el sorgo mutante, la hipótesis fue rechazada debido a una pobre conversión alimenticia en comparación con las aves alimentadas con maíz y sorgos normales. Elkin et al (2002) indican que estos resultados probablemente están involucrados con el componente energético del grano, ya que este sorgo mutante posee menos almidón debido a su mayor proporción de endospermo vítreo, en comparación con los sorgos normales ocupados, 58 vs 66%, respectivamente.

2.4.2. Kafirinas y dureza del grano

En el sorgo los términos dureza, fuerza y vitrosidad son utilizados como sinónimos, pese a no tratarse de los mismos fenómenos y no entenderse claramente su relación a nivel bioquímico (Chandrashekar et al., 1999). El término aquí ocupado será dureza para referirse a la habilidad del grano para resistir a fuerzas aplicadas sobre él sin ceder o fracturarse. En el sorgo hay una correlación directa entre la proporción del endospermo vítreo y el harinoso. Los granos duros son ricos en endospermo vítreo y producen partículas grandes en relación con los suaves (Kirleis et al., 1984).

En el sorgo, se ha mostrado que los granos duros contienen más kafirinas totales que los granos suaves (Cagampan et al., 1984; Chandrashekar y Kirleis, 1988, Shull et al., 1990). Al ser cuantificadas por ELISA, los niveles de las kafirinas α , β y γ son altas en el grano con endospermo duro; la cantidad de γ kafirina es particularmente alta en los granos duros y en las porciones externas traslúcidas del endospermo, comparado con las porciones externas traslúcidas de granos suaves (Chandrashekar y Mazhart, 1999).

Es evidente que las kafirinas son un factor importante en la dureza del grano, y la analogía ocupada por Chandrashekar (1999) es apropiada: las α Kafirinas son los ladrillos y las γ kafirinas son el cemento. La dureza afecta varios aspectos del procesamiento del cereal (Cagampan et al., 1984) y le da resistencia al ataque de hongos (Sunitha et al., 1992) y de insectos (Chandrashekar y Mazhart, 1999).

2.4.3. Efecto de las kafirinas en la digestibilidad del almidón del sorgo

El almidón es el almacén de polisacáridos de las plantas superiores y la principal fuente de energía para los animales. Como característica los cereales tienen poca cantidad de proteína en relación con el almidón (Rooney y Pflugfelder, 1986). En el caso del sorgo, éste tiene en promedio 9.40% de proteína contra 64.10 % de almidón (INRA-AFZ). En el endospermo, los gránulos de almidón y el cuerpo de las proteínas se encuentran en una estrecha relación; los gránulos de almidón están rodeados por numerosos cuerpos de proteína (Seckinger y Wolf, 1973; Watson, 1984; Shull et al., 1990).

Como previamente se ha descrito, la γ kafirina y en menor cantidad, la β kafirina encapsulan a la más abundante y digestible α kafirina. En el endospermo córneo la γ y β kafirinas además forman puentes disulfuro con las proteínas no kafirinas (albumina, globulina y glutelina) conformando una matriz que rodea a los gránulos de almidón. Esta matriz proteica parece funcionar como una barrera para la gelatinización del almidón y su digestión. Así, las proteínas afectan las propiedades funcionales del almidón, como la gelatinización y la tasa de digestión (Chandrashekar y Kirleis, 1988; Duodu et al., 2002; Ezeogu et al., 2005, 2008).

La particularidad de la formación de la matriz proteica y su interacción con el almidón es clave en la calidad nutritiva del sorgo. El tratamiento con pronasa, que hidroliza la matriz proteica, incrementa significativamente la tasa de hidrólisis de almidón *in vitro*, debido al incremento en el área de superficie de contacto del almidón con la amiloglucosidasa (Rooney y Miller, 1982; Rooney y Pflugfelder, 1986). Granos de sorgo ricos en kafirinas y mayor cantidad de puentes desulfuro, muestran una menor capacidad de gelatinización (Chandrashekar y Kirleis, 1988; Ezeogu et al., 2005, 2008). El uso de agentes reductores, que rompen los puentes disulfuro de la matriz proteica, incrementan el grado de la gelatinización del almidón y su digestión (Zhang y Hamaker, 1998; Elkhailifa et al., 1999; Ezeogu et al., 2005, 2008).

III. Justificación.

Diversos estudios in vitro muestran que las kafirinas afectan negativamente la digestibilidad de proteína y energía sin embargo esto no ha sido evaluado in vivo así como su posible interacción con los taninos por lo que resulta de interés determinar este efecto in vivo.

IV. Material y métodos

El experimento se realizó en la unidad metabólica de la granja experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicada en Colón, Ajuchitlán, Querétaro. El trabajo respetó los lineamientos de la norma oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial, 2001).

4.1. Animales

Se utilizaron 12 cerdos híbridos Duroc x Landrace, machos castrados, con un peso de 60 kg, a los cuales se les implantó una cánula simple en "T" (Figura 6) en el íleon terminal, con la siguiente metodología: a los cerdos se les indujo la anestesia con Azaperona (400 mg/10 kg de peso por vía intramuscular); una vez tranquilizados, los cerdos se rasuraron en el flanco derecho y, posteriormente, se anestesiaron con Enflurano, aplicado a razón de 400ml/5.5 l de oxígeno por minuto (Figura 7).

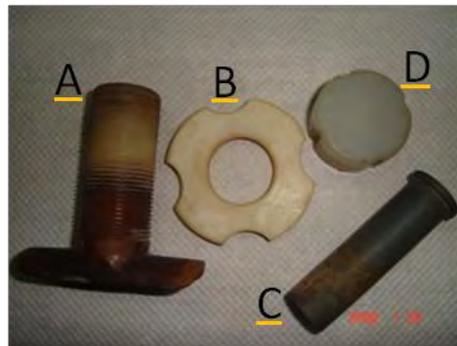


Figura 6. Cánula simple en "T". A: Cuerpo con alas en semicírculo, B: Rondana, C: Embolo y D: Tapón.



Figura 7. Cerdo con anestesia inhalada (Enfrane 400ml/5.5 l de O/min).c

Una vez anestesiados, la zona quirúrgica (flanco derecho) se lavó con jabón quirúrgico y se desinfectó con solución yodada. Se realizó una incisión en el ijar derecho; cada uno de los planos musculares (músculo oblicuo externo, oblicuo interno y transversal abdominal) se diseccionó sin cortar sus fibras, únicamente separándolas con la apertura de unas tijeras de punta roma y, en un segundo tiempo, con las yemas de los dedos; esto dio como resultado una incisión con una dirección diferente en cada plano anatómico, lo que permitió soportar mejor el peso de las vísceras y una cicatrización más rápida del tejido.

Se realizó una incisión dorso-ventral en el peritoneo; ya en cavidad abdominal se localizó el intestino grueso por su color más oscuro y menos rosado que el del intestino delgado, se localizó el ligamento íleo-cecal (Figura 8) el cual sirvió de referencia para desplazarse alrededor de 10 cm hacia la porción ventral del intestino. El íleon se incidió longitudinalmente, se colocó y fijó la cánula, lo cual se hizo primero por puntos separados y, posteriormente, con una sutura en jareta. Para exteriorizar la cánula se realizó una segunda incisión en la parte superior del ijar derecho (Figura 9). Finalmente se suturaron los planos quirúrgicos (Reis de Souza et al., 2000).



Figura 8. Presentación del ligamento ileocecal.



Figura 9. Exteriorización de la cánula a través de la segunda incisión.

Después de la cirugía los cerdos se alojaron individualmente en jaulas metabólicas localizadas en un corral con temperatura controlada a 19 ± 2 °C. En el periodo post quirúrgico de 21 días, los cerdos se alimentaron dos veces al día (09:00 h y 16:00 h); la cantidad de alimento se incrementó diariamente hasta que los animales alcanzaron el nivel de consumo previo a la cirugía. Durante el periodo experimental los cerdos recibieron 2.5 veces su requerimiento de ED de mantenimiento, el cual se estimó en 460 MJ de ED por kg de PV^{0.75} (INRA, 1984). El agua se proporcionó a libertad a través de un bebedero de chupón, localizado en una pared de la jaula metabólica. Al final del periodo experimental los cerdos se sacrificaron utilizando CO₂, lo que permitió verificar la ausencia de fístulas a nivel de intestino delgado que invalidara las mediciones de digestibilidad.

4.2. Tratamientos

Se produjeron tres híbridos de sorgo, uno con una concentración baja de taninos (<0.5%), uno con una concentración media de taninos (0.5 a 1.5%) y uno con una concentración alta de taninos (>4%). Con base en estudios previos (Mariscal-Landín et al., 2004) se eligieron los siguientes híbridos: sorgo bajo en taninos (5300 R ABT), sorgo con contenido medio de taninos (Dekalb D-66) y sorgo alto en taninos (Pioneer 81G67). La mitad de la parcela de cada híbrido se fertilizó normalmente (42.5 kg de urea/Ha) y la otra mitad con exceso de nitrógeno (58.8 kg de urea/Ha) para incrementar el contenido de proteína del grano de sorgo. Con este manejo se conto con tres pares de combinaciones, que fueron los tratamientos (Figura 10).

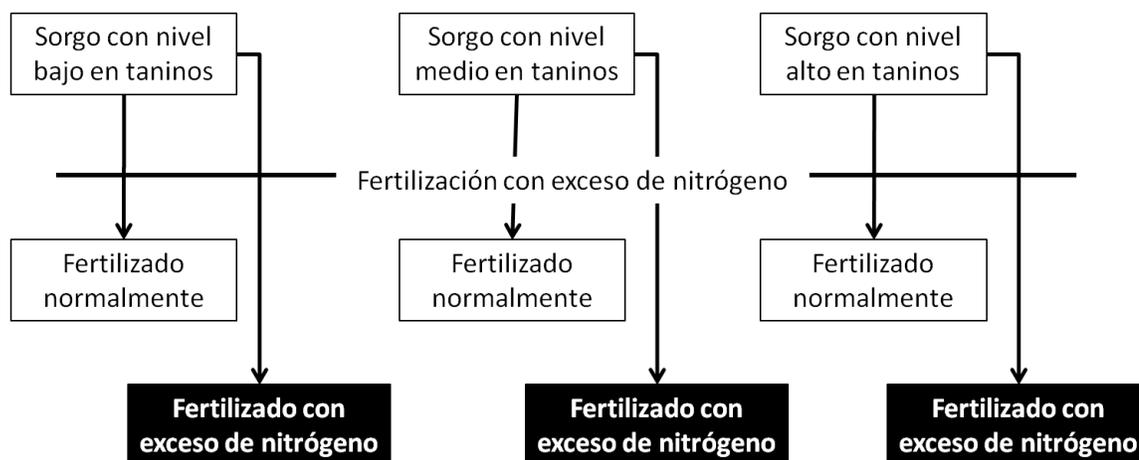


Figura 10. Manejo para obtener los 6 tratamientos ocupados en el experimento.

4.3. Dietas

Las dietas de los tratamientos experimentales se elaboraron con base en sorgo como única fuente de proteína. Todas las dietas contenían aceite de maíz, carbonato de calcio, ortofosfato, sal y premezcla de vitaminas y minerales. El aceite de maíz se incluyó a razón de 40 g kg^{-1} de alimento con el objeto de reducir el polvo de las dietas. Las vitaminas y minerales se adicionaron para proporcionar o exceder los requerimientos recomendados por el NRC (1998). Se incluyó sesquióxido de cromo a razón de 3 g kg^{-1} como marcador de digestibilidad (Cuadro 4). El periodo experimental tuvo una duración de siete días: cinco de adaptación a la dieta y dos de colecta ileal (Figura 11).

Cuadro 4. Composición porcentual de las dietas ocupadas en el experimento.

Ingrediente	Tratamiento					
	A	B	C	D	E	F
Sorgo	94.3	94.6	93.0	94.6	94.6	93.3
Almidón	0.3	0.0	1.6	0.0	0.0	1.3
Premezcla de minerales ¹	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Premezcla de vitaminas ²	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Aceite	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Sal	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fosfato Bicálcico	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Carbonato de Ca	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Sesquióxido de cromo	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Tratamientos: A= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado normalmente; B= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; C= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado normalmente; D= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; E= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado normalmente; F= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

¹Premezcla de minerales que aporta por Kg. de dieta: Vitamina A 10,200 UI; D 1,980 UI; E 60 UI; K 1.20 mg; Colina 967 mg; Niacina 36 mg; Ácido Pantoténico 17 mg; Rivo flavina 7.2 mg; Vitamina B12 38 µg; Tiamina 0.30 mg; Piridoxina 0.31 mg; Biotina 0.08 mg; Ácido Fólico 0.75 mg. ²

Premezcla de vitaminas que aporta por Kg. de dieta: Cu 14.4 mg; I 800 mg; Fe 105 mg; Mn 36 mg; Se 0.3 mg; Zn 144 mg.

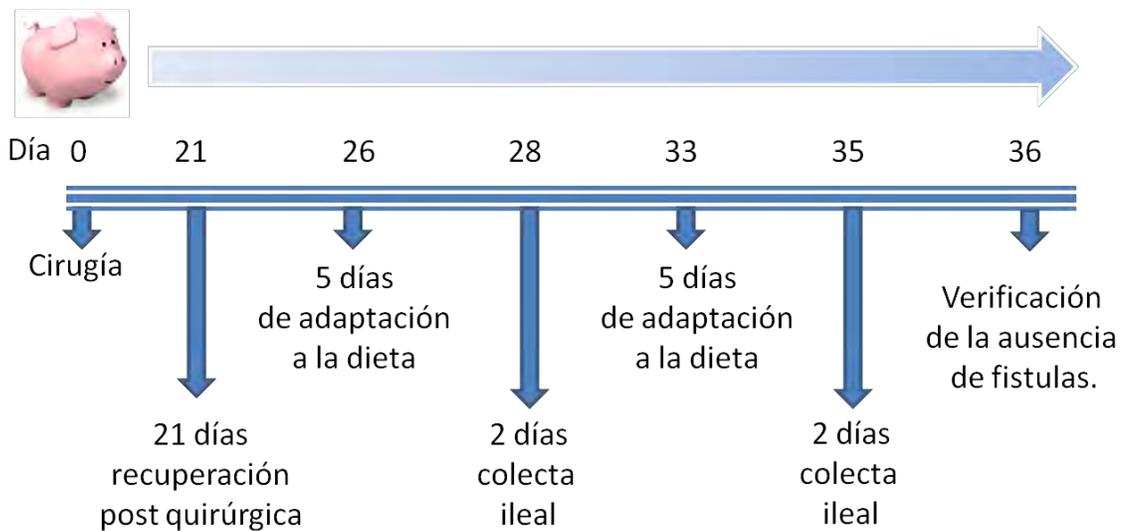


Figura 11. Cronograma de la prueba de digestibilidad.

4.4. Muestreo

La digesta ileal se recolectó en bolsas de plástico (de 11 cm de largo x 5 cm de ancho), a las cuales se les agregaron 10 ml de una solución de HCl 0.2 M con el objeto de bloquear toda actividad bacteriana. Las bolsas se fijaron a la cánula con una liga a las 0800 h del día uno y se colectó la digesta ileal de las 08:00 a las 1000 h, posteriormente se recolectó digesta ileal una hora si y otra hora no hasta las 0900 del día dos. El día dos se colectó digesta ileal de las 0900 a las 1100 h y posteriormente se colectó digesta una hora si y otra hora no hasta las 0800 del día tres cuando finalizó el periodo de colecta. Conforme se recolectó, la digesta ileal se transfirió a un contenedor para proceder inmediatamente a congelarla a -20 °C hasta su liofilización.

4.5. Análisis de laboratorio

4.5.1. Obtención del perfil de proteínas de los sorgos

El fraccionamiento de las proteínas se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Youssef (1998). Las muestras de sorgo se desengrasaron por el método Soxhlet. De manera sucesiva se obtuvieron las fracciones de acuerdo con los siguientes extractantes (Cuadro 5):

Cuadro 5. Disolventes para la obtención de las fracciones proteínicas del sorgo.

Fracción	Disolventes
Albúminas	Agua
Globulinas	Cloruro de sodio al 5%
Kafirinas	Solución de terbutanol al 60%, conteniendo 0.1% de hidrocloreuro de guanidina
Kafirinas ligadas	Solución de terbutanol al 60%, conteniendo 0.1% de hidrocloreuro de guanidina y 0.6% de mercaptoetanol
Glutelinas	Solución buffer de borato, conteniendo borato de sodio al 0.5% 0.6 M de mercaptoetanol y 0.5 M de dodecil sulfato de sodio con un pH 10

Exceptuando la fracción de albúminas, los sobrenadantes conteniendo las otras fracciones de proteínas se dializaron por 48 horas en agua destilada con un cambio a las 24 horas en refrigeración antes de ser liofilizadas y pesadas (Figura 12).

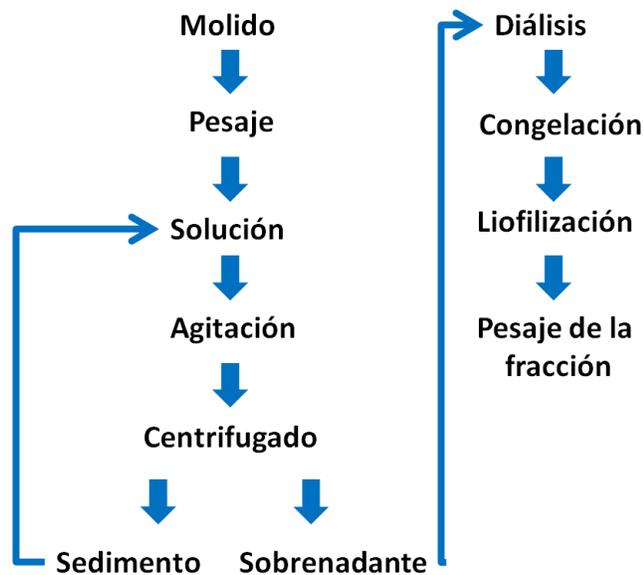


Figura 12. Secuencia para la obtención de fracciones proteínicas del sorgo.

4.5.2. Separación electroforética de las proteínas de sorgo

El gel de electroforesis de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) se corrió utilizando un sistema vertical de mini gel (Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad). El gel de resolución consistió en 15% poliacrilamida en 0.3M tris(hidroximetil)aminometano [Tris buffer] (pH 8.8) y 0.1% SDS (P/V). El gel concentrador consistió en 4% de poliacrilamida, 0.125M Tris buffer (pH 6.8) y 0.1% de SDS (P/V). Se usaron Tetrametilethilenediamina 2.5% (5 μ L) y persulfato de amonio 5% (10 μ L) para polimerizar los gels; 50 μ g de proteína de cada una de las fracciones se mezclaron en relación 2:1

con el buffer de muestra (0.0132M Tris-HCl, 2% SDS, pH 6.8, 10% glicerol, 0.05% azul de bromofenol y 2% 2-mercaptoetanol) y fueron calentados en un recipiente con agua a 95°C por 4 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se cargaron en cada pozo. La electroforesis se realizó a 100V por 2 horas en buffer de tanque que consistió en 0.2M tris, 0.19M glicina y 0.1% SDS (p/v). El gel se lavó dos veces durante 5 minutos con agua destilada, se fijó por una hora con una solución de metanol al 40%, 10% de ácido acético y 50% de H₂O; se tiñó en agitación por 45 minutos con azul de Coomassie, se lavó dos veces por 5 minutos con agua destilada, y se destiñó con una solución de metanol al 40%, 10% de ácido acético y de 50% H₂O. El gel se fotografió con una cámara digital y se transfirió la imagen al programa analizador de imágenes Kodak 1D.

4.5.3. Producción de un anticuerpo policlonal contra las kafirinas

La extracción del antígeno se realizó a partir de 1 g de sorgo molido. La muestra se desengrasó por el método Soxhlet, se obtuvo la fracción 4 y se dializó por 48 horas en agua destilada con un cambio a las 24 horas en refrigeración; se liofilizó y se evaluó su perfil electroforético en geles de poliacrilamida al 12%. Las kafirinas extraídas se utilizaron para inmunizar 4 conejas Nueva Zelanda de 3 meses, utilizando dos esquemas: dos recibieron dosis alta (inmunización primaria con 0.5 mg de antígeno y un refuerzo con 0.25mg) y dos recibieron dosis baja (inmunización primaria con 0.25 mg y un refuerzo con 0.125mg). Adicionalmente, se utilizó una coneja sin tratar, como testigo negativo. La dosis correspondiente de kafirinas se diluyó en 500 µl de PBS, adicionado con 5% (v/v) de SDS y 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol y se emulsificaron con 500 µl de adyuvante completo de Freund en la inmunización primaria (figura 13), que se aplicó vía intradérmica en 20 puntos distribuidos en el dorso, o con 500 µl de adyuvante incompleto para la inmunización de refuerzo, que se aplicó también vía subcutánea (García-Casanova et al; 2008). Los animales se sangraron antes de las inmunizaciones y a los 15, 21 y 28 días de la inmunización primaria (figura 14).



Figura 13. Emulsificación con adyuvante completo de Freund.



Figura 14. Sangrado previo a la inmunización.

Después del último sangrado las conejas se sacrificaron y desangraron para recolectar el suero. El monitoreo de la respuesta inmune se realizó por medio de dot blot (Figura 15). Los sueros de las cuatro conejas obtenidos antes de la inmunización y el testigo negativo mostraron resultados negativos en dot blot. A los 15 días post-inoculación, el suero de una coneja inoculada con dosis alta fue positivo (dilución 1:400). A los 21 días post inmunización todas las conejas fueron reactivas (dilución 1:3,200). La reacción fue igual de intensa en todas las conejas sin importar la dosis utilizada. Al día 28 post-inmunización la reacción fue positiva 1:6,400. Para la prueba de sensibilidad se decidió emplear la dilución 1:800, en la cual en tres de cuatro sueros se detectaron hasta 1.25 μg de antígeno.

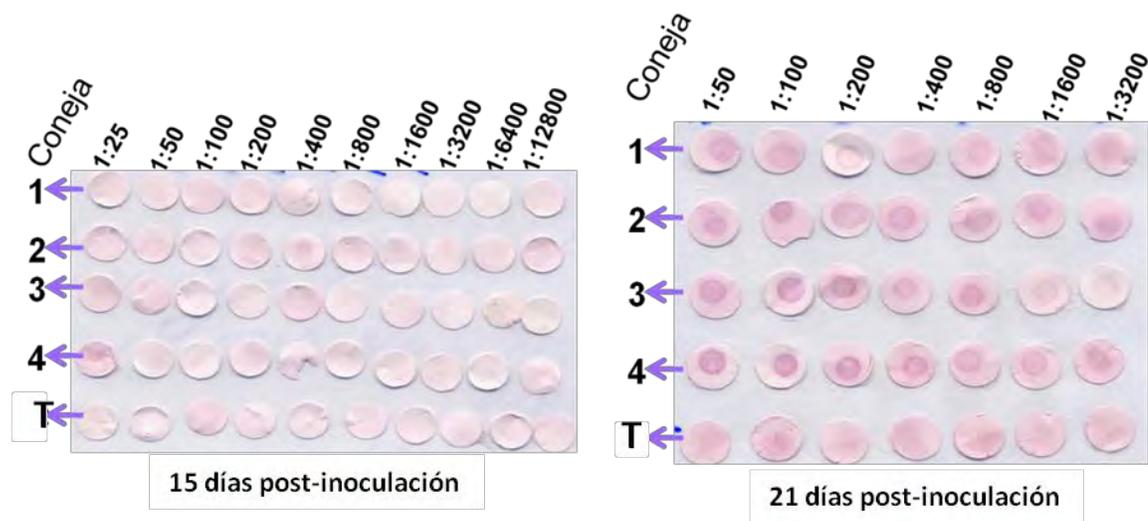


Figura 15. Monitoreo de la respuesta inmune por medio de dot blot a los 15 y 21 post-inoculación.
T: coneja testigo.

Cuando se emplearon las kafirinas extraídas de sorgos en los sueros obtenidos antes de la inoculación no se reconocieron bandas en western blot, sin embargo, en los obtenidos a los 15 y 28 días se detectaron tres bandas de 70, 68 y 60 kDa y tres bandas con mayor intensidad de 26, 24, 22 kDa. Sólo el suero de una de las conejas mostró una fuerte reacción hacia todas las bandas. Al utilizar los sueros en western blot de digestas ileales liofilizadas se detectaron dos bandas, una de 24 kDa y la otra de menos de 10 kDa. Por lo tanto se decidió que la sensibilidad de los anticuerpos obtenidos era confiable para detectar kafirinas en digestas ileales.

4.5.4. Western blot

La extracción de kafirinas de las digestas se realizó a partir de 0.1 g de digesta ileal desengrasada, con terbutanol al 60%, con agitación constante de 6 horas a temperatura ambiente; las muestras se dializaron y liofilizaron. Se mezcló (2:1) 50 µg de proteína de cada una de las digestas con buffer de muestra y se calentó en un recipiente con agua a 95°C por 4 minutos; se enfrió a temperatura ambiente y se cargo cada pozo.

La electroforesis se realizó a 100 V por 2 horas. Las proteínas se transfirieron de los geles SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979), usando un sistema de buffer continuo [39 mM glicina, 48 mM Tris, 0.0375% SDS (w/v) y 20% metanol (v/v)]. El tiempo de la transferencia fue de 45 minutos a 23 volts. La unión no específica de anticuerpos a las membranas fue bloqueada con leche deshidratada y desengrasada al 5% (p/vol) con buffer salino de fosfato-Tween-20 [PBS-T (137 mM NaCl, 2.7mM KCL, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, Tween-20 .05%)]; se incubó por 18 horas a 4°C con el anticuerpo anti-kafirinas diluido con leche al 5%-PBS-T (1:100); se lavó en agitación por 10 minutos con 15 ml de PBS-T tres veces; se incubó con el segundo

anticuerpo Anti-IgG de conejo HRP elaborado en burro (Santa Cruz Biotechnology. Delaware, CA) el cual se diluyó en PBS-T 5% leche (1:2000); se lavó en agitación por 10 minutos con 15 ml PBS-T tres veces y se reveló con Nova Red (Vector). Las membranas se fotografiaron con una cámara digital y se transfirió la imagen al programa analizador de imágenes Kodak 1D.

4.5.5 Análisis químicos

Las muestras de dietas experimentales, los híbridos de sorgos producidos (5300 R ABT, Dekalb D-66 y Pioneer 81G67) y digesta ileal (previa liofilización) se molieron a través de una malla de 0.5 mm, en un molino de laboratorio (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, PA) y se les analizó: materia seca (MS), proteína cruda (PC) por los métodos 934.01 y 976.05 del AOAC (2002) y energía bruta (EB) por el método calorimétrico (Bomba Parr 1266. Illinois). Además a las muestras de sorgo se les determinó: fibra detergente neutro (FDN) según Van Soest et al. (1991) y taninos (Price et al., 1978) y a las muestras de digesta y dietas experimentales se les determinó cromo (Fenton y Fenton, 1979).

4.5.6 Prueba de digestibilidad

La digestibilidad ileal aparente (DIA) de MS, PC y EB se calculo de acuerdo con la ecuación:

$$\text{DIA, \%} = 1 - [(\text{nutriente digesta} / \text{nutriente dieta}) * (\text{marcador dieta} / \text{marcador digesta})] \times 100$$

La digestibilidad ileal estandarizada de PC se calculo de acuerdo con los valores reportados por Mariscal-Landin y Reiz de Souza (2006) y con la ecuación:

$$\text{DIS, \%} = \text{DIA} + [(\text{pérdida de PC endógena basal} / \text{PC en la dieta}) \times 100]$$

4.6. Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron los coeficientes de digestibilidad ileal aparente y estandarizada de la proteína cruda y energía. Se utilizó un diseño en cross-over, conocido también como diseño change-over, donde cada uno de las animales recibe dos o más tratamientos y en el cual el orden de aplicación de dichos tratamientos a los diversos animales está determinado por la estructura del propio diseño. El diseño cross-over ocupado es el conocido como 2 x 2 (2 tratamientos - 2 períodos). En esta disposición, la mitad de los animales recibe el tratamiento A y posteriormente cambia y recibe el tratamiento B; la otra mitad recibe los tratamientos en orden inverso (Figura 16). De este modo quedan definidos dos grupos experimentales diferenciados por la secuencia de aplicación de los tratamientos (Cuadro 6). El principal propósito es sustraer de las comparaciones de los tratamientos cualquier componente que se refiera a las diferencias entre sujetos.

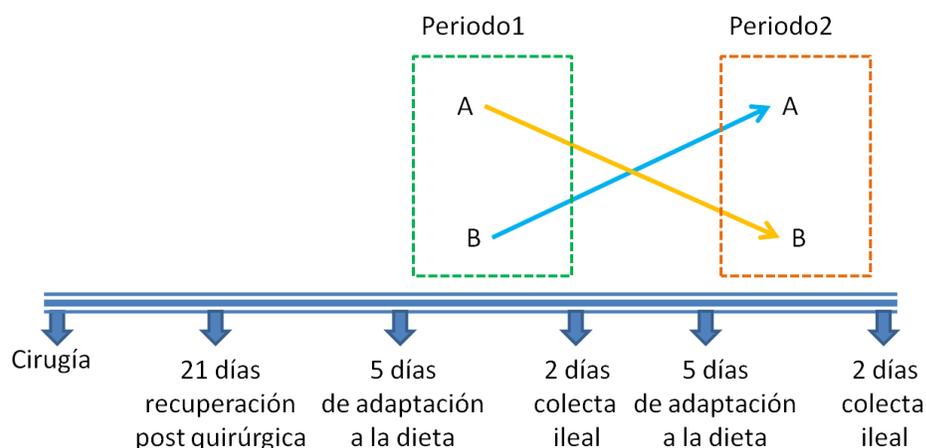


Figura 16. Diseño cross-over para el experimento.

Cuadro 6. Grupos experimentales

Número de animales.	Periodo	
	1	2
2	A	B
2	B	A
2	C	D
2	D	C
2	E	F
2	F	E

Tratamientos: A= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado normalmente; B= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; C= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado normalmente; D= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; E= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado normalmente; F= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable a analizar del i-ésima secuencia en el j-ésimo animal, en el k-ésimo periodo y el l-ésimo tratamiento.

μ : Es el efecto de la media general.

α_i : Es el efecto del i -ésima secuencia.

$\beta_{j(i)}$: Es el efecto del j-ésimo animal anidado en la i-ésima secuencia.

γ_k : Es el efecto del k-ésimo período.

δ_l : Es el efecto l-ésimo tratamiento.

ε_{ijk} : Es el efecto del error experimental asociado con la observación de la i -ésima secuencia en el j-ésimo animal, en el k-ésimo periodo y el l-ésimo tratamiento.

Los datos se analizaron empleando el Procedimiento "Mixed" del paquete estadístico SAS (SAS V.9.2, 2008).

V Resultados

5.1. Composición química

Los valores de los taninos encontrados fueron los esperados para los híbridos utilizados, los valores de MS, EB, PC, grasa, FDN y cenizas fueron similares para los tres híbridos cuando fueron fertilizados normalmente o con exceso de nitrógeno (cuadro 7).

Cuadro 7. Composición química de los sorgos ocupados en el experimento.

Análisis	Tratamiento					
	A	B	C	D	E	F
MS, g/kg MS	917.7	908.5	916.4	915.6	920.3	917.0
PC, g/kg MS	125.1	124.7	123.9	120.9	122.4	124.1
EB, kcal/kg MS	4268.9	4525.9	4362.0	4428.5	4238.0	4439.1
Grasa, g/kg MS	21.4	24.3	23.1	21.6	21.7	23.2
FDN, g/kg MS	85.1	82.0	77.4	80.3	140.4	144.5
Cenizas, g/kg MS	14.9	14.8	17.7	16.9	24.5	26.7
Taninos, g/kg MS	< 0.02	< 0.02	6.2	6.2	57.5	54.7

Tratamientos: A= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado normalmente; B= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; C= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado normalmente; D= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno; E= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado normalmente; F= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

5.2. Perfil de proteínas

Los valores de proteína cruda y de las fracciones proteínicas de los sorgos fertilizados normalmente o con exceso de nitrógeno fueron similares para los tres híbridos (cuadros 8,9 y 10); solo en el híbrido con nivel bajo de taninos hubo una diferente proporción de las kafirinas 1 (solubles en alcohol) y kafirinas 2 (solubles en alcohol más un agente reductor), siendo mayor la proporción de kafirinas 2 en el sorgo que fue fertilizado con exceso de nitrógeno (cuadro 8 y figura17).

Cuadro 8. Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones protéicas del sorgo con concentración baja de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Fracción	Tratamientos	
	A	B
%PC.	12.5	12.4
%Albúmina	3.45	3.50
%Globulina	4.55	4.45
%Kafirinas 1	27.2	21.2
%Kafirinas 2	36.4	42.0
%K. Totales	63.6	63.2
%Glutelinas	15.1	15.0
No extraíble	13.3	13.8

Tratamientos: A= Sorgo con concentración baja de taninos fertilizado normalmente; B= Sorgo con concentración baja de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

Cuadro 9. Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones protéicas del sorgo con concentración media de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Fracción	Tratamientos	
	C	D
%PC.	12.3	12.0
%Albúmina	3.4	3.52
%Globulina	4.6	4.5
%Kafirinas 1	27.3	27.1
%Kafirinas 2	36.3	36.7
%K. Totales.	63.6	63.7
%Glutelinas	15.0	14.7
No extraíble	13.5	13.6

Tratamientos: C= Sorgo con concentración media de taninos fertilizado normalmente; D= Sorgo con concentración media de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno

Cuadro 10. Porcentaje de proteína cruda (PC) y fracciones proteínicas del sorgo con concentración alta de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Fracción	Tratamientos	
	E	F
%PC.	12.2	12.4
%Albúmina	2.98	2.95
%Globulina	4.12	4.11
%Kafirinas 1	25.1	25.0
%Kafirinas 2	38.2	38.2
%K. Totales.	63.2	63.2
%Glutelinas	15.9	16.0
No extraíble	13.7	13.7

Tratamientos: E= Sorgo con concentración alta de taninos fertilizado normalmente; F= Sorgo con concentración alta de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

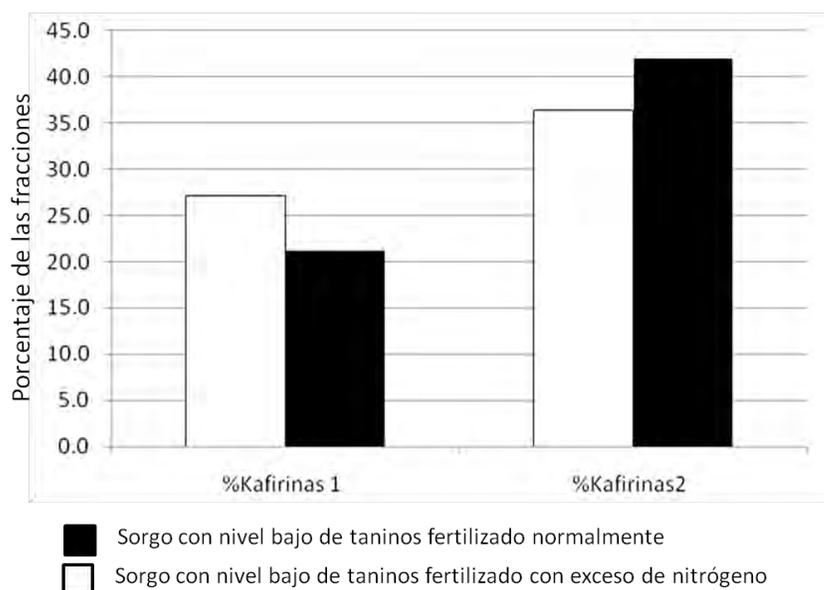
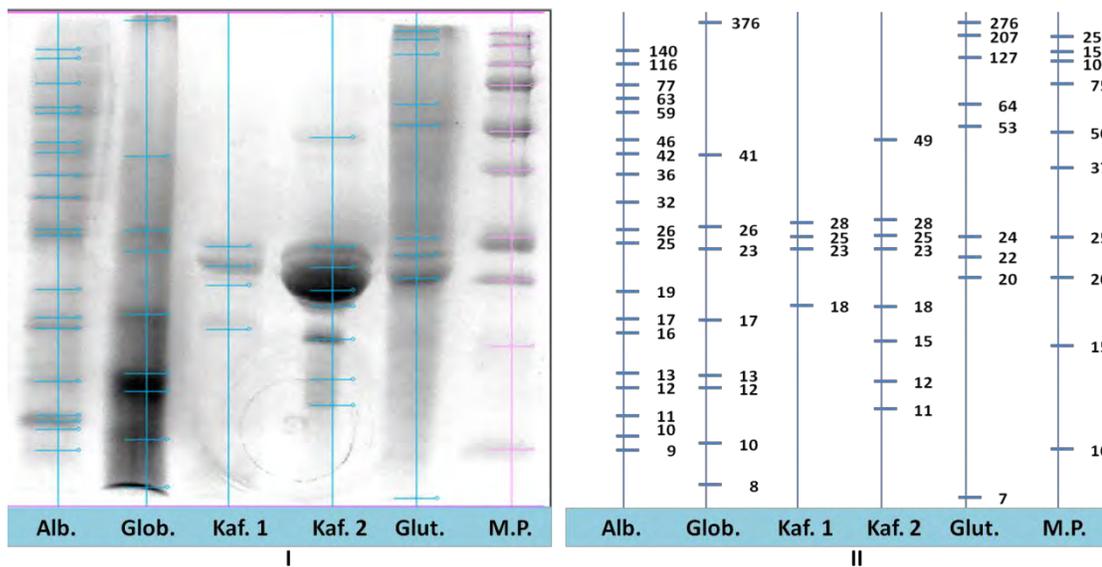


Figura 17. Porcentaje de kafirinas 1 (solubles en alcohol) y kafirinas 2 (solubles en alcohol + agente reductor) del sorgo con concentración baja de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

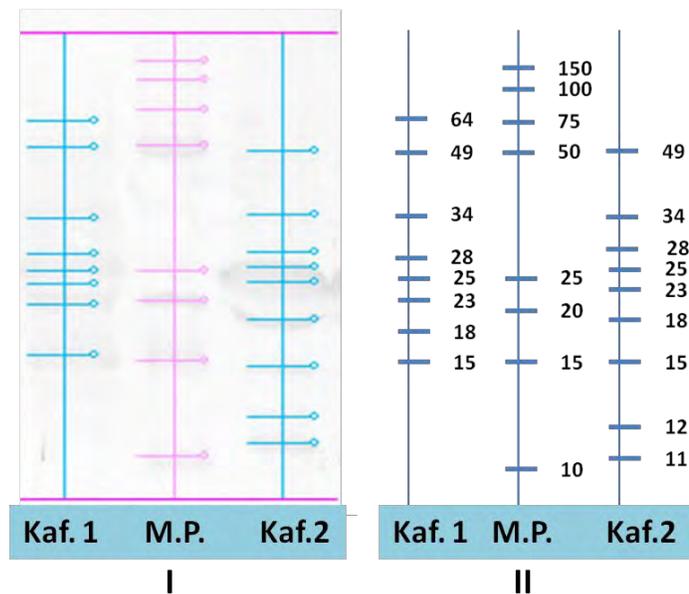
El gel de poliacrilamida de las fracciones proteínicas del sorgo mostró las subclasificaciones de kafirinas previamente reportadas: la α kafirina de 25 y 23 KDa, la β kafirina de 15 y 12 KDa y la γ

kafirina de 28.31 KDa (figura 18); además, en la fracción de kafirinas 2 (solubles en alcohol más un agente reductor) se encontraron dos bandas de 12.6 y 11.09 KDa que no han sido descritas previamente y que fueron confirmadas por el western blot de kafirinas (figura 19).



Alb: Albuminas, Glob: Globulinas, Kaf. 1: Kafirinas 1, Kaf. 2: Kafirinas 2, Glut: Glutelinas, M.P.: Marcador de peso molecular.

Figura 18. I Fotografía de gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS PAGE) 15% con fracciones protéicas del sorgo analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Pesos moleculares (kDa) de las fracciones protéicas del sorgo calculadas por el programa Kodak 1D a partir del marcador de peso molecular (MPM).



Kaf. 1= Kafirinas 1, M.P.M.: Marcador de peso molecular y Kaf. 2: Kafirinas 2.

Figura 19. I Fotografía del western blot de kafirinas y kafirinas ligadas analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Pesos moleculares (kDa) de kafirinas 1 y 2 de los sorgos, calculados por el programa Kodak 1D a partir del marcador de peso molecular (MP).

5.3. Prueba de digestibilidad

El híbrido bajo en taninos con fertilización normal presento una DIA y una DIE de la proteína mayor que el sorgo con exceso de fertilización ($P < 0.05$) (cuadro 11). No hubo diferencia en las pruebas de digestibilidad para los sorgos con nivel medio y alto en taninos (cuadros 12 y 13).

Cuadro 11. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel bajo en taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Prueba	Tratamientos		EEM	Valor P
	A	B		
DIA MS	83.9	81.1	0.01	0.10
DIA P	74.5	69.3	0.01	0.04
DIE P	86.8	81.3	0.01	0.04
DIA EB	84.6	82.2	0.01	0.13

Tratamientos: A= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado normalmente; B= Sorgo con nivel bajo de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

Cuadro 12. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel medio de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Prueba	Tratamientos		EEM	Valor P
	C	D		
DIA MS	80.4	81.5	0.01	0.26
DIA P	71.1	72.4	0.01	0.38
DIE P	83.4	84.7	0.01	0.42
DIA EB	81.4	81.8	0.01	0.65

Tratamientos: C= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado normalmente; D= Sorgo con nivel medio de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno

Cuadro 13. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel alto de taninos fertilizado normalmente y con exceso de nitrógeno.

Prueba	Tratamientos		EEM	Valor P
	E	F		
DIA MS	72.7	73.3	0.02	0.73
DIA P	59.1	64.0	0.03	0.22
DIE P	71.6	75.9	0.03	0.22
DIA EB	74.3	76.0	0.02	0.50

Tratamientos: E= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado normalmente; F= Sorgo con nivel alto de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno.

El análisis en conjunto de los tres híbridos mostró que la digestibilidad ileal de la materia seca y de la energía, así como la digestibilidad aparente y estandarizada de la proteína del sorgo con nivel alto de taninos fue menor que la de los sorgos con nivel medio y bajo de taninos (cuadro 14).

Cuadro 14. Coeficientes de digestibilidad ileal aparente (DIA) para materia seca (MS), proteína (P) y energía bruta (EB) y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para proteína de los sorgos con nivel bajo, medio y alto en taninos.

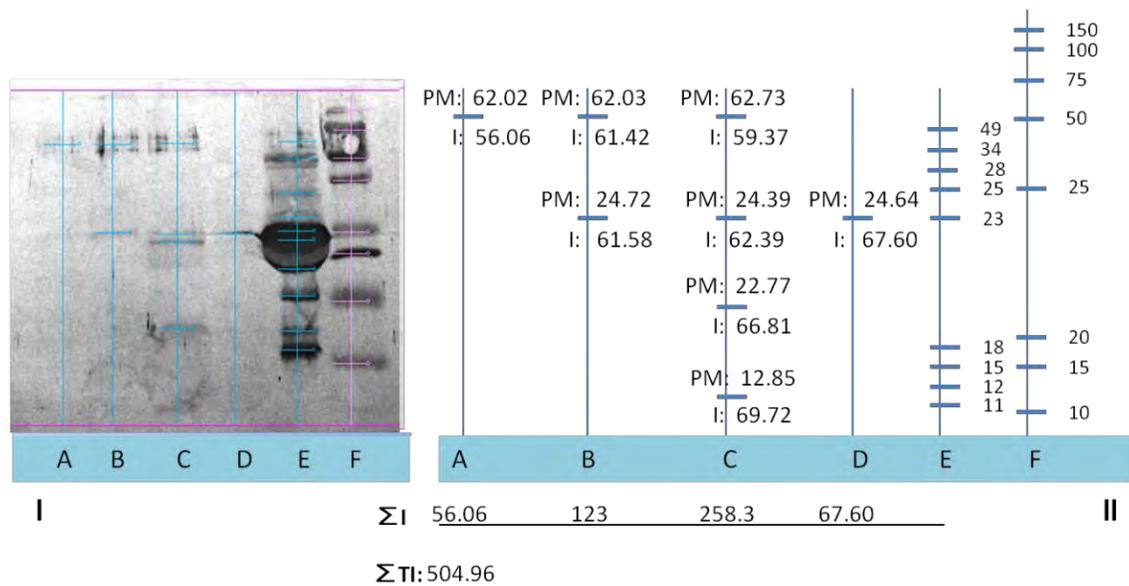
Prueba	Tratamientos			EEM
	A	B	C	
DIA MS	0.83 ^a	0.81 ^a	0.75 ^b	0.02
DIA P	0.82 ^a	0.80 ^a	0.73 ^b	0.02
DIE P	0.71 ^a	0.71 ^a	0.61 ^b	0.03
DIA E	0.84 ^a	0.84 ^a	0.73 ^b	0.03

^{a-b} Medias con diferente letra no significativamente diferentes. (P < 0.0001)

Tratamientos: A= Sorgo con nivel bajo en taninos; B= Sorgo con nivel medio en taninos; C= Sorgo con nivel alto en taninos

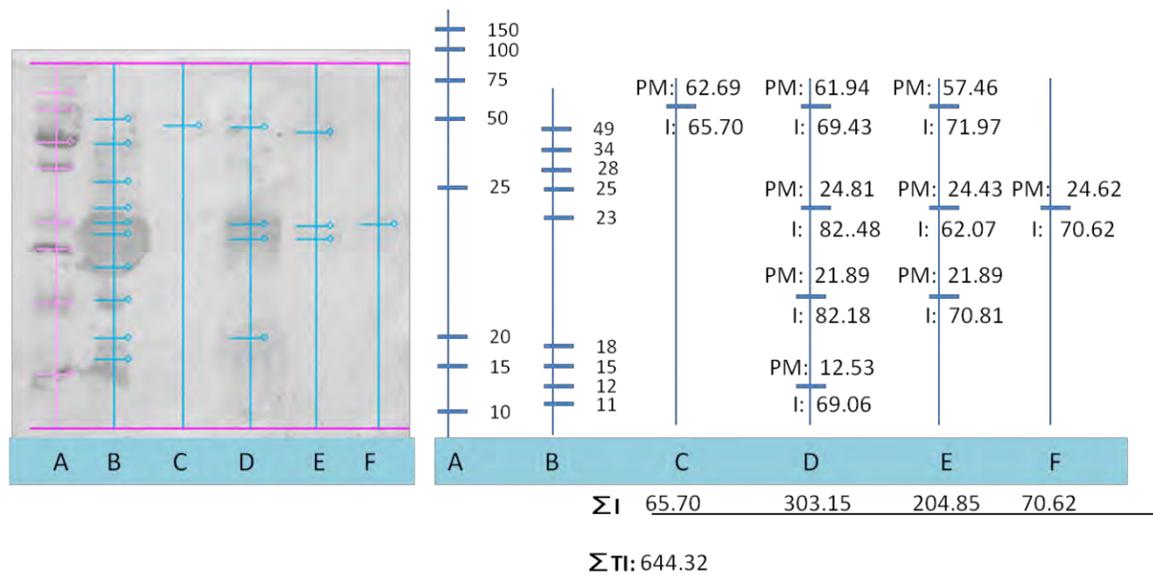
5.4. Análisis de digestas por western blot

Los western blot de las digestas de los cerdos que consumieron el sorgo con nivel bajo de taninos tanto el que fue fertilizado normalmente como en el fertilizado con exceso de nitrógeno, tuvieron reconocimiento de bandas para todos los animales, la intensidad total de las bandas detectadas en las digestas de los animales que recibieron el sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno fue superior a la intensidad total de las bandas detectadas en las digestas de los animales que recibieron el sorgo que se fertilizó normalmente (Figuras 20 y 21).



A=Animal 1, B=Animal 2, C=Animal 3, D= Animal 4, E= control kafirinas, F=marcador de peso molecular, ΣI = Sumatoria intensidad en el animal, ΣTI =Sumatoria total de la intensidad.

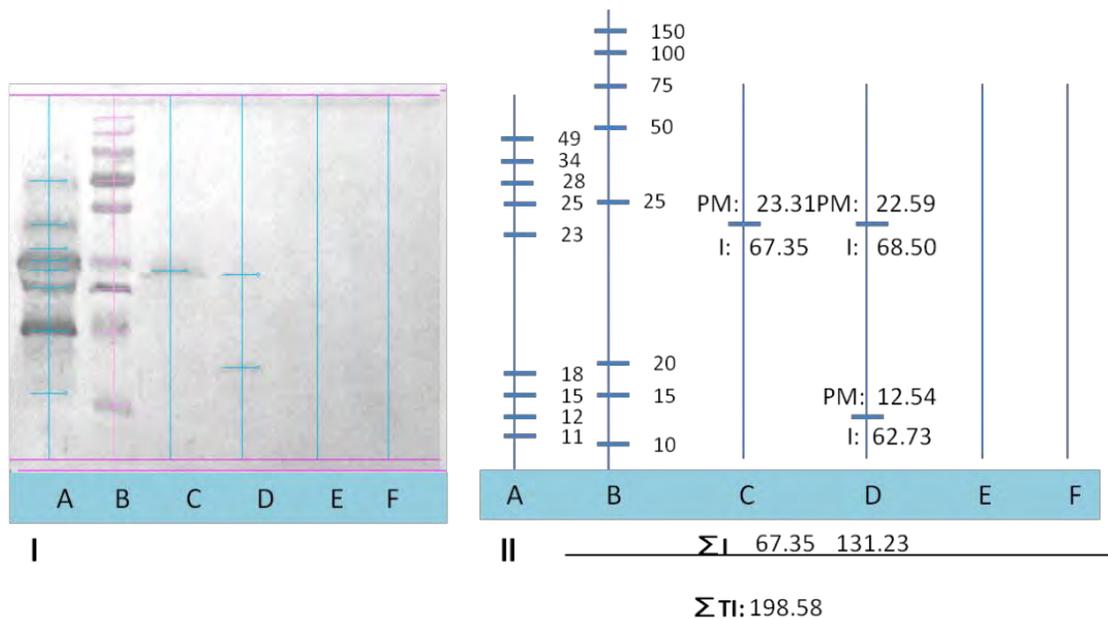
Figura 20. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo bajo en taninos con fertilización normal analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.



A=marcador de peso molecular, B= control Kafirinas, C=Animal 1, D=Animal 2, E=Animal 3, F= Animal 4, ΣI = Sumatoria intensidad en el animal, ΣTI =Sumatoria total de la intensidad.

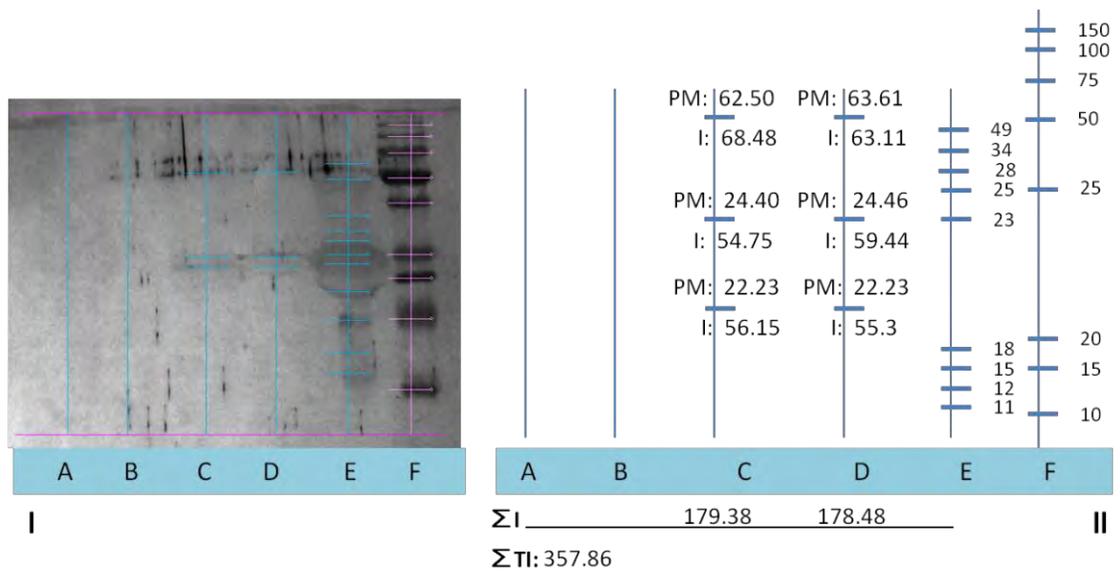
Figura 21. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo bajo en taninos fertilizados con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.

EL western blot correspondiente al tratamiento con concentración media de taninos y fertilizado normalmente, mostró bandas en sólo dos de las digestas de los animales en tratamiento, de forma similar en el western blot del tratamiento con concentración media de taninos y fertilizado con exceso de nitrógeno sólo mostró bandas en las digestas de dos de los animales, sin embargo, hubo un mayor número de bandas (Figuras 22 y 23).



A=marcador de peso molecular, B= control Kafirinas, C=Animal 1, D=Animal 2, E=Animal 3, F= Animal 4, ΣI = Sumatoria intensidad en el animal, ΣTI =Sumatoria total de la intensidad.

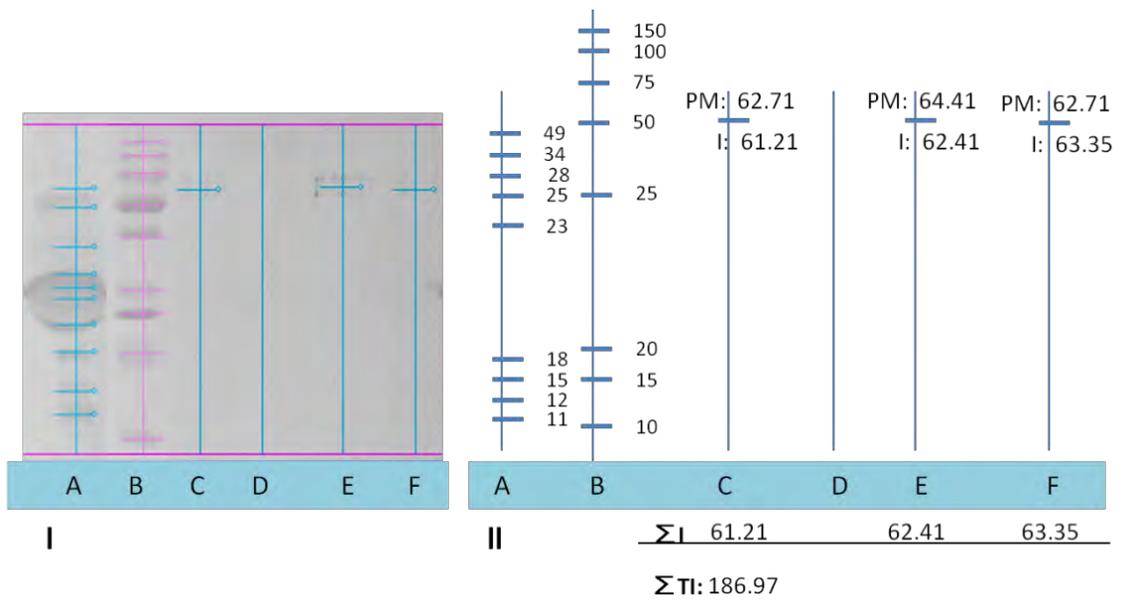
Figura 22. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración media de taninos fertilizado normalmente analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.



A=Animal 1, B=Animal 2, C=Animal 3, D= Animal 4, E= control Kafirinas, F=marcador de peso molecular, ΣI = Sumatoria intensidad en el animal, ΣTI =Sumatoria total de la intensidad.

Figura 23. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración media de taninos con fertilizado con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas calculados por el programa Kodak 1D.

Los western blot de los tratamientos con sorgo alto en taninos fertilizado normalmente y fertilizado con exceso de nitrógeno sólo mostraron bandas correspondientes a polímeros de kafirinas en tres de los cuatro animales de cada tratamiento (Figuras 24 y 25).



A=marcador de peso, B= control Kafirinas,C=Animal 1, D=Animal 2, E=Animal 3, F= Animal 4, molecular, ΣI = Sumatoria intensidad en el animal, ΣTI =Sumatoria total de la intensidad.

Figura 24. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración alta de taninos, fertilizado normalmente analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.

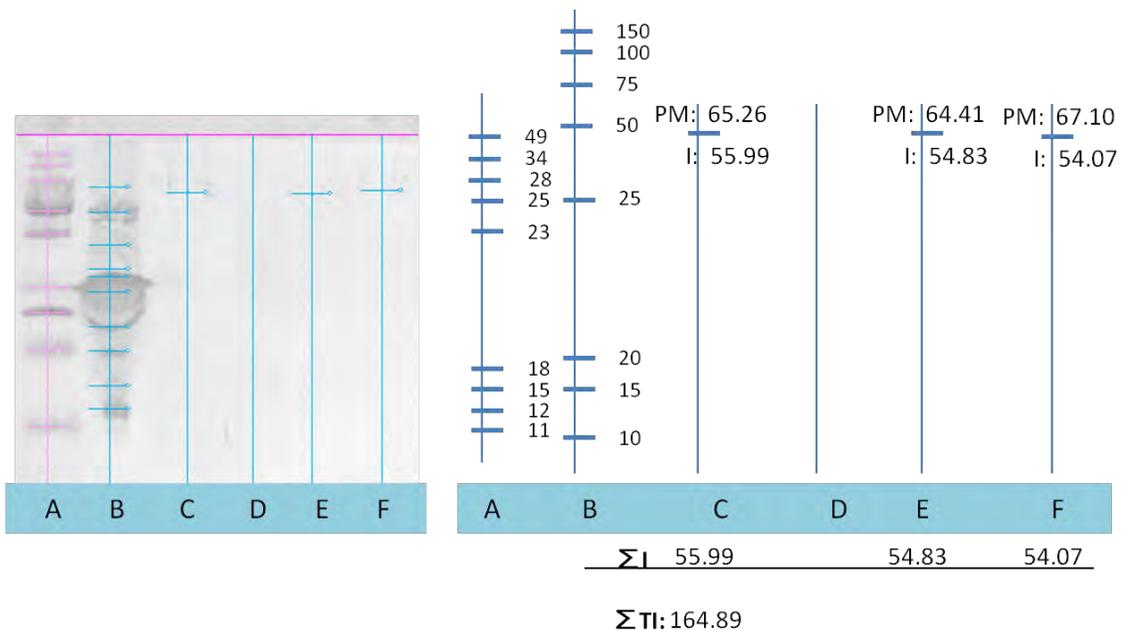


Figura 25. I Fotografía digital de western blot de digestas de los animales que consumieron sorgo con concentración alta de taninos fertilizado con exceso de nitrógeno analizada con reconocimiento de líneas y bandas por el programa Kodak 1D. II Representación diagramática del western blot, indicando peso molecular (PM) e intensidad (I) de las bandas encontradas en las digestas, calculados por el programa Kodak 1D.

Las bandas encontradas en los western blot de todos los tratamientos mostraron pesos inferiores a las bandas de las kafirinas y sus polímeros de estas encontradas en el western blot del sorgo a excepción de 2 bandas detectadas en el tratamiento del sorgo alto en taninos con fertilizado con exceso de nitrógeno.

VI Discusión.

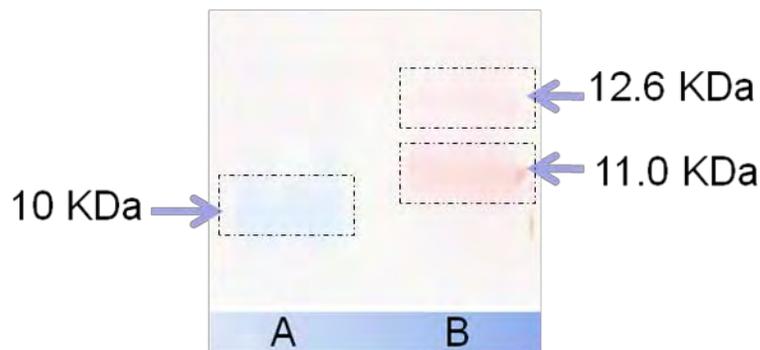
6.1. Perfil de proteínas

Los resultados de PC observados en los sorgos fertilizados con exceso de nitrógeno y aquellos fertilizados normalmente para los tres diferentes híbridos fueron similares, así como el porcentaje de las kafirinas totales (kafirinas solubles en alcohol más kafirinas solubles en alcohol más un agente reductor); esto probablemente se deba a que el nivel de N empleado satisfizo los requerimientos de los híbridos por un mayor aporte de N del suelo al esperado.

La mayor proporción de kafirinas ligadas en todos los sorgos del presente estudio coincide con los datos consignados por Hamaker et al. (1986), Jambunathan y Mertz (1973), Guiragossian et al. (1978), Vivas et al. (1992) y Hamaker et al. (1995). La proporción de kafirinas (solubles en alcohol) y kafirinas ligadas (solubles en alcohol más un agente reductor) en los híbridos fertilizados normalmente y con exceso de nitrógeno fueron similares, excepto en el sorgo bajo en taninos, presentando una mayor proporción de kafirinas ligadas y menor de en el sorgo con exceso de fertilización.

En el western blot realizado a la fracción de kafirinas solubles en alcohol más un agente reductor se detectaron dos bandas más de 12.60 y 11.09 KDa (Figura 26) que no han sido descritas anteriormente. Esto probablemente se deba a que en los trabajos en que se han realizado western blot se han utilizado anticuerpos para la detección específica de kafirina α , β y γ (Mazhar et al; 1995) o con anticuerpos contra zeinas (prolaminas del maíz) α , β y γ (Shull et al; 1991), lo cual evito la localización de otras kafirinas.

Figura 26. Fotografía western blot de kafirinas con peso molecular de 11.09 y 12.60 KDa.



A=Marcador de peso molecular, B=kafirinas.

En el maíz se ha descrito la zeína δ (Coleman y Larkins, 1999) y en secuencias de ADN clonadas de sorgo se han identificado dos secuencias con alta homología con la zeína δ ; sin embargo, estas no han podido ser detectadas en SDS-PAGE. La masa molecular calculada para la kafirina δ es de 12.9 kDa (Belton et al; 2006), lo que coincide con la banda de mayor peso encontrada.

6.2. Prueba de digestibilidad

En el híbrido con concentración baja de taninos, el sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno mostró una menor DIA y DIE de proteína, coincidiendo esto con una mayor proporción de kafirinas solubles en alcohol más un agente reductor en el sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno. Estos resultados sugieren una potencial relación entre la solubilidad de las kafirinas y su digestibilidad: en el sorgo es más abundante la cantidad de kafirinas solubles en alcohol más un agente reductor que las que sólo lo son en alcohol (Hamaker et al., 1986; Jambunathan y Mertz, 1973; Guiragossian et al., 1978; Vivas et al., 1992; Hamaker et al., 1994). Esto es opuesto a lo que sucede con las prolaminas del maíz, en las cuales las zeínas solubles en alcohol son las más abundantes (Hamaker et al., 1986, 1994; Vivas et al., 1992; Landry y Moureaux, 1980), lo cual es relevante por la mayor digestibilidad de la proteína del maíz (Maclean et al., 1981; Axtell et al., 1981). Además se ha señalado que cuando el sorgo se cocina, disminuye su digestibilidad y se vuelve menos soluble por el incremento de puentes disulfuro (Hamaker et al., 1986). Así, la mayor proporción de kafirinas ligadas en el sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno está relacionada a una mayor cantidad de puentes disulfuro y una menor digestibilidad.

Sorgos con mayor cantidad de puentes disulfuro muestran una menor capacidad de gelatinización del almidón (Chandrashekar y Kirleis, 1988; Ezeoguet al., 2005, 2008, Wong et al., 2009), debido a la manera en que los cuerpos de proteína están organizados alrededor de los gránulos de almidón y que parecen funcionar como una barrera para su gelatinización. Los resultados de este estudio muestran una tendencia ($P=0.13$) a una menor digestibilidad de la energía, lo que podría deberse al efecto detrimental de los cuerpos proteína sobre la digestibilidad de almidón.

En los híbridos con concentración media y alta de taninos, los resultados de los análisis químicos y del perfil de proteínas fue muy similar entre los sorgos fertilizados normalmente y los fertilizados con exceso de nitrógeno, lo cual es congruente con los resultados de la prueba de digestibilidad donde no se observaron diferencias.

6.3. Análisis de digestas por western blot

En los western blot de las digestas de los animales que recibieron el híbrido con concentración baja de taninos, el sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno presentó 9 bandas mientras que el del sorgo fertilizado normalmente 8 bandas, que probablemente son digestiones de los polímeros de 64 kDa y de las kafirinas α y de la banda de 12 kDa encontradas en el western blot de las kafirinas ya que su peso es ligeramente menor. La intensidad total del western blot de las digestas del sorgo sobrefertilizado es 29.05% mayor que la del sorgo fertilizado normalmente. Una mayor

intensidad se relaciona con una mayor interacción antígeno-anticuerpo. Esto concuerda con la menor digestibilidad del sorgo con mayor proporción de kafirinas ligadas, ya que se puede considerar que una proteína menos digestible es menos susceptible a proteólisis (Duodu et al, 2003) y hay mayor probabilidad de ser reconocida por el anticuerpo. En concierto con esto, la digesta que presentó mayor número de bandas y de mayor intensidad coincidió con el animal que tuvo la menor digestibilidad en el grupo.

El western blot de las digestas de los animales que recibieron el híbrido con concentración media de taninos en ambos tratamientos solo mostró bandas en dos de los cuatro animales. Naushad et al. (2003) consigna que los taninos tienen una alta afinidad por las kafirinas y se unen de forma permanente, debido a su preferencia por ligarse a la prolina, aminoácido abundante, en las kafirinas (Hagerman y Butler, 1981; Mitaru et al., 1984; Charlton et al., 2002). Los taninos, al interactuar con las proteínas, modifican su conformación (Duodu et al., 2003) y esto probablemente afectó negativamente a la interacción antígeno-anticuerpo, lo cual explicaría la no detección de bandas en algunos animales (Figura 27).

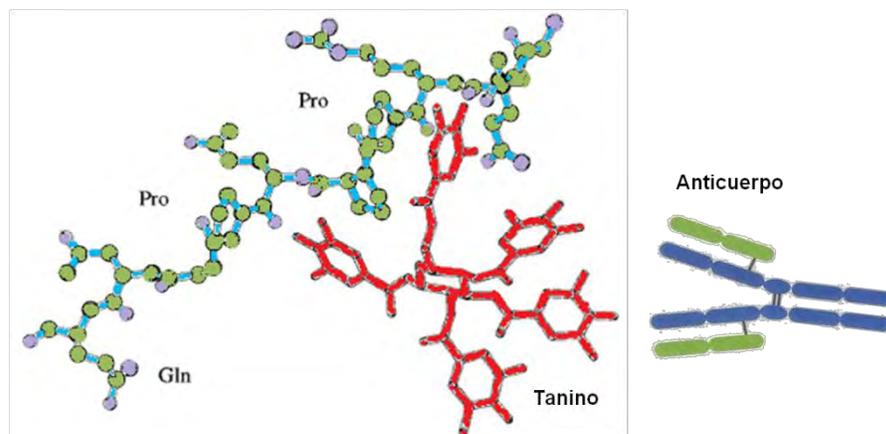


Figura 27. Interacción propuesta entre taninos y residuos de prolina (Adaptado de Baxter et al , 1999).

El western blot de las digestas de los animales que recibieron el híbrido con concentración alta de taninos con los tratamientos de fertilización, únicamente detectó polímeros y dos de la bandas encontradas en el western blot del tratamiento del sorgo fertilizado con exceso de nitrógeno tienen pesos superiores a los encontrados en el western blot del sorgo fertilizado normalmente, la causa de esto probablemente fue la elevada cantidad de taninos encontradas en este híbrido (5.02 %), lo cual, además de afectar negativamente la interacción antígeno-anticuerpo, es capaz de inhibir la actividad enzimática (Al-Mamary et al., 2001; Horigome et al., 1988) y favorecer la no digestión de polímeros su formación (Figura 28).

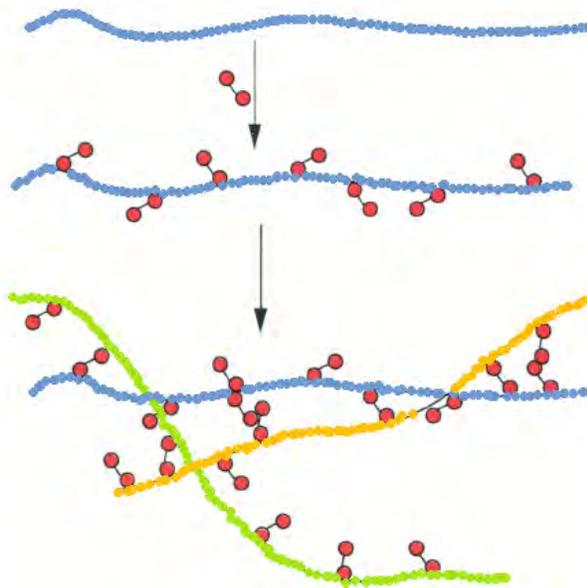


Figura 28. Modelo de interacción entre proteínas y taninos (Adaptado de Williamson, 1994).

Analizando en conjunto los datos de los tres híbridos, la digestibilidad ileal de la materia seca y de la energía bruta, así como la digestibilidad aparente y estandarizada de la proteína del sorgo con nivel alto en taninos fue menor que la de los sorgos con nivel medio y bajo de taninos. Esto probablemente se debió a la variedad de efectos de los taninos, los cuales forman complejos tanino-proteína indigestibles (Butler et al., 1984), inhiben la actividad enzimática de tripsina (Al-Mamary et al., 2001; Horigome et al., 1988) y amilasa (Al-Mamary et al., 2001; Horigome et al., 1988) y lipasa (Al-Mamary et al., 2001) y provocan la secreción en saliva de una proteína ácida rica en prolina (PRP) como medio de defensa (Jansman, 1993) la cual llega a generar una digestibilidad ileal aparente negativa de prolina (Mariscal-Landín et al., 2004). Además, en comparación con los otros dos híbridos, este sorgo tuvo una mayor cantidad de FDN, la cual afecta la digestibilidad de la proteína cruda (Montagne et al., 2001; Lallès et al., 2004).

La no diferencia en la prueba de digestibilidad asociada a taninos entre los sorgos con concentración baja y media de taninos concuerda con lo señalado por Mariscal-Landin et al (2004), que solo observaron efectos claramente negativos cuando los taninos están en grandes cantidades (4 % o más). Sin embargo, comparando los western blot de las digestas de sorgo bajo en taninos con los del sorgo con nivel medio de taninos, claramente hubo un mayor número de bandas y su intensidad fue mayor, lo que probablemente se debió al efecto negativo de los taninos, como ya se ha expuesto.

VII Conclusiones

Una mayor proporción de kafirinas ligadas (kafirinas solubles en alcohol + un agente reductor) en el sorgo afectó negativamente la digestibilidad aparente y estandarizada a nivel ileal de la proteína y existió una tendencia a una baja digestibilidad de energía.

La composición química de las kafirinas (ricas en puentes disulfuro) afecta la digestibilidad *in vivo* de la proteína del sorgo en cerdos en crecimiento

La solubilidad de las kafirinas presentes en el sorgo es un posible indicador de la digestibilidad de su proteína en sorgos con bajo contenido de taninos.

El sorgo expresó una o dos kafirinas distintas a las ya descritas en la literatura.

7.1. Impacto del trabajo sobre el uso del sorgo en la alimentación del cerdo.

Para la formulación de dietas es necesario conocer de cada ingrediente la composición de nutrientes y su digestibilidad. En el caso de la proteína el conocimiento de su digestibilidad, permite una mayor aproximación a los requerimientos conocidos de aminoácidos para el cerdo. Es notable que en cada edición hay cambios en los valores de los cuadros de composición de los ingredientes, debido al mejoramiento en los procedimientos analíticos. En este sentido, este trabajo provee evidencia del efecto de las kafirinas, efecto a ser considerado como un factor importante en la digestibilidad de aminoácidos, lo que permitirá una formulación más precisa para lograr cubrir las necesidades del cerdo.

Además, el trabajo señala una posible correlación entre la solubilidad de las kafirinas y la digestibilidad ileal aparente y estandarizada de la proteína del sorgo, la cual podría utilizarse en análisis de regresión.

Finalmente, el trabajo aporta la evidencia de la expresión de una nueva kafirina, cuyo efecto en la digestibilidad de la proteína del sorgo es necesario investigar.

VII Referencias.

- Al-Mamary M, Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Obeidi A. In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutr. Res.* 2001; 21: 1393-1401.
- Aminodat. 1996. Degussa AG. Frankfurt Germany.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA.
- Axtell JD, Kirleis A, Hassen MM, D’Croz-Mason N, Mertz E.T, Munck L. Digestibility of sorghum proteins. *PNAS.* 1981; 78: 1333–1335.
- Bach-Knudsen BKE, Kirleis AW, Eggum BO, Munck L. Carbohydrate composition and nutritional quality for rats of sorghum t \hat{o} prepared from decorticated white and whole grain red flour. *J. Nutr.* 1988: 118; 588–597.
- Bach-Knudsen BKE, Munck L. Dietary fibre contents and compositions of sorghum and sorghum-based foods. *J. Cereal Sci.* 1985; 3: 153-164
- Banda-Nyirenda BGD, Vohra P, Ingebretson KH. Nutritional evaluation of some varieties of sorghums (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Cereal Chem.* 1987; 64: 413–417.
- Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry.* 1997; 36: 5566-5577
- Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR. Kafirin structure and functionality. *J Cereal Sci.* 2006; 44: 272–286.
- Belton PS, Taylor JRN. Sorghum. In Belton PS y Taylor JRN editors. *Pseudocereals and less common cereals.* Berlin: Springer. 2002. 25-91.
- Bengala FJ, Peiniau J, Lebreton Y., Aumaitre A. Determination of ileal digestibility by shunt technique in the early-weaned pig: methodological aspects and utilization of starch-rich diets. *Livest. Prod. Sci.* 1988; 20:233-241.
- Butler LG, Riedl DJ, Lebryk DG, Blytt HJ. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. *J Am Oil Chem S.* 1984; 61: 916–920.
- Cagampang GB, Kirleis AW. Relationship of sorghum grain hardness to selected physical and chemical measurements of grain quality. *Cereal Chem.* 1984; 61: 100-105.
- Coleman CE, Larkins BA. Prolamins of maize. En *Seed Proteins.* Ed. Shewry PR, Casey R. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999. 109–139.

Chamba EB, Halford NG, Forsyth J, Wilkinson M, Shewry PR. Molecular cloning of b-kafirin, a methionine-rich protein of sorghum grain. *J Cereal Sci.* 2005; 41: 381–383.

Chandrashekar A, Mazhar H. The Biochemical basis and implications of grain strength in Sorghum and Maize. *J Cereal Sci.* 1999; 30: 193-207.

Chandrashekar A, Kirleis AW. Influence of protein on starch gelatinisation in sorghum. *Cereal Chem.* 1988; 65: 457-462.

Charlton AJ, Baxter NJ, Lockman Khan M, Moir AJG, Haslam E, Davis AP, Williamson MP. Polyphenol peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1593–1601.

De Barros EG, Takasaki K, Kirleis AW, Larkins BA. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding g-kafirin protein from *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 1991; 97: 1606–1607.

De Lange CMF, Souffrant WB, Sauer WC. Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the 15 N-Isotope dilution technique. *J. Anim. Sci.* 1990; 68: 409-418.

Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana –NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. 2001.

Donkoh A y Moughan PJ. The effect of dietary crudeprotein content on apparent and true ileal nitrogen and AA digestibilities. *Br. J. Nutr.* 1994; 72: 59–68.

Douglas JH, Sullivan TW, Bond PL, Struwe FJ. Nutrient composition and metabolizable energy values of selected grain sorghum varieties and yellow corn. *Poult. Sci.* 1990; 69: 1147-1155.

Dowling LF, Arndt C, Hamaker BR. Economic viability of high digestibility sorghum as feed for market broilers. *Agron J.* 2002; 94: 1050–1058.

Duodu KG, Nunes A, Delgadillo I, Parker LM, Mills ENC, Belton PS, Taylor RN. Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility. *J Cereal Sci.* 2002; 35: 161–174.

Duodu KG, Taylor JRN, Belton PS, Hamaker BR. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J Cereal Sci.* 2003; 38, 117–131.

Earp CF, McDonough CM, Awika JM, Rooney LW. Microscopic changes during development of sorghums with and without pigmented testa. *J. Cereal Sci.* 2004; 39: 153-161.

- Ebadi MR, Pourreza J, Jamalian J, Edriss MA, Samie AH, Mirhadi SA. Amino acid content and availability in low medium and high tannin sorghum grain for poultry. *Int J. of Poult. Sci.* 2005.1, 27–31.
- Elkhalifa AEO, Chandrashekar A, Mohamed BE, El Tinay AH. Effect of reducing agents on the in vitro protein and starch digestibilities of cooked sorghum. *Food Chem.*1999; 66: 323–326.
- Emmambux MN, Taylor JRN. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *J Sci Food Agr.* 2003; 83: 402–407.
- Emmambux MN, Taylor JRN. Properties of heat-treated sorghum and maize meal and their prolamin proteins. *J Sci Food Agr.* 2009; 57: 1045-1050.
- Elkin RG, Arthur E, Hamaker BR, Axtell JD, Douglas MW, Parsons CM. Nutritional value of a highly digestible sorghum cultivar for meat-type chickens. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4146–4150.
- Elkin RG, Freed MB, Hamaker BR, Zhang Y, Parsons CM. Condensed Tannins Are Only Partially Responsible for Variations in Nutrient Digestibilities of Sorghum Grain Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 848–853.
- El Nour INA, Peruffo ADB, Curioni A. Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour. *J. Cereal Sci.* 1998; 28: 197–207.
- Eskin NAM y Przybylski R. Antioxidants and shelf life of food in Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes, Florida CRS press. 2001. 175-209.
- Ezeogu LI, Duodu KG, Taylor JRN. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the in vitro starch digestibility of sorghum and maize flours. *J. Cereal Sci.* 2005; 42: 33–44.
- Ezeogu LI, Duodu KG, Emmambux MN, Taylor JRN. Influence of cooking conditions on the protein matrix of sorghum and maize endosperm flours. *Cereal Chem.* 2008; 85: 397–402.
- Fan MZ, Sauer WC, Hardin RT, Lien KA. Determination of apparent ileal AA digestibility in pigs: Effect of dietary AA level. *J. Anim. Sci.* 1994; 72: 2851–2859
- Fan MZ, Sauer WC, McBurney MI. Estimation by regression analysis of endogenous amino acid levels in digesta collected from the distal ileum of pigs. *J. Anim. Sci.* 1995; 73:2319-2328.
- FAO, 1999. Production Yearbook, Vol 53, Food Agriculture Organization, Rome Italy, pp 79-81.
- Fenton TW, Fenton M. An improved procedure for determination of chromic oxide in feed and feces. *Can. J. Anim. Sci.* 1979; 59: 631-634.

- Fuller MAA. Bioavailability A brief history, in Ball RO, editor. Digestive Physiology in Pigs. Proc. 9th Intl. Symp. Vol. 1. Univ. Alberta, Alberta, Canada . 2003. 183–198.
- Furuya S, Kaji Y. Estimation of the true ileal digestibility of amino acids and nitrogen from their apparent values for growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 1991; 26:271-285.
- Garcia-Casanova L, Jiménez-Severiano H, Hernández CL, Mariscal-Landín 1, Reis de Souza TC, Mar-Botello. Produccion y caracterizacion de un anticuerpo policlonal contra kafirinas del sorgo. Pag. 187. 2008. XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; Yucatán Mexico.
- Gualtieri M, Rapaccini S. Sorghum grain in poultry feeding. World's Poult Sci J. 1990; 46: 246–254.
- Guiragossian VB, Chibber S, Van Scoyoc R, Jambunathan E, Mertz J, Axtell. Characteristics of protein from normal, high lysine and high tannin sorghum. J. Agric. Food Chem. 1978; 26: 219-223.
- Hagemeister H y Ebersdobler H. Chemical labeling of dietary protein by transformation of lysine to homoarginine: A new technique to follow intestinal digestion and absorption. Proc. Nutr. Soc. 1985; 44: 133-138.
- Hagerman AE, Butler LG. Specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J. Biol. Chem. 1981; 256: 4494-4497.
- Hagerman AE. Tannin Chemistry. <http://www.users.muohio.edu/hagermae>. Accessed Oct. 04, 2010.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Mertz ET, Axtell JD. Effect of cooking on the protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize. J. Agric. Food Chem. 1986; 34: 647–649.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Butler LG, Axtell JD, Mertz, E.T. Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. P. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84: 626–628.
- Hamaker BR, Mohamed AA, Habben JE, Huang CP, Larkins BA. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. Cereal Chem. 1995; 72: 583–588.
- Hicks C, Bean SR, Lookhart GL, Pedersen JF, Kofoid KD, Tuinstra MR. Genetic analysis of kafirins and their phenotypic correlations with feed quality traits, in vitro digestibility, and seed weight in grain sorghum. Cereal Chem. 2001; 78: 412–416.
- Horigome T, Kumar R, Okamoto K. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. Br. J. Nutr. 1988; 60: 275-285.
- Hoseney RC. Principles of Cereal Science and Technology. 2nd ed, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1994.139-141.

- INRA AFZ. Tables of composition and nutritive value of feed materials Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish. Sauvant D, Perez JM, Tran G, Editors. Versailles. INRA Editions 2004.
- INRA. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France.1984.
- Izquierdo L, Godwin ID. Molecular characterization of novel methioninerich delta-kafirin seed storage protein gene in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Cereal Chem.* 2005; 82: 706-712.
- Jambunathan R y Mertz ET. Relationship between tannin levels, rat growth and distribution of proteins in sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 1973; 21: 692–696.
- Jansman AJM. Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutr. Res. Rev.* 1993; 6:209–236.
- Jansman AJM, Enting H, Verstegen MWA, Huisman J. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. *Br. J. Nutr.* 1994; 71: 627-641.
- Jansman AJM, Smink W, Van Leeuwen P, Rademacher M. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2002; 98: 49-60.
- Jondreville C, Van den Broecke J, Gatel F, Van Cauwenberghe S. Ileal digestibility of AAin feedstuffs for pigs. Eurolysine/ITFC publication, Paris, France. 1995.
- Kirby LK, Nelson TS, Johnson ZB, York JO. The effect of seed coat color of hybrid sorghum grain on the ability of chicks to digest dry matter and amino acids and to utilize energy. *Nutr. Rep. Int.* 1983; 27: 831-836.
- Kirleis AW, Crosby KD, Housley TL.A. Method for quantitatively measuring vitreous endosperm in sectioned sorghum grain. *Cereal Chem.* 1984; 61: 556-558.
- Kodak 1D. V.3.5.4. Kodak Scientific Imaging Systems. USA. 1994.
- Krawielitzki K, Volker R, Smulikowska S, Bock HD, Wuensche J. Weitere Untersuchungen zum Multi-kompartiment-Modell des Proteinstoffwechsels. *Arch Anim. Nutr.* 1977; 27:609–621.
- Lallès JP, Boundry G, Favier C, Le Floc’h N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel C, Sève B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 2004; 53: 301-316.
- Landry J, Moureaux T. Hétérogénéité des glutélines du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bulletin de la Société de chimie Biologique.* 1970; 52: 1021–1037.

- Leite A, Neto GC, Vettore AL, Yunes JA, Arruda P, The prolamins of sorghum, Coix and millets. In: Shewry PR, Casey R. Editors. Seed Proteins. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1999. 141–157.
- MacLean WC, Lopez de Romanna G, Placko RP, Graham GG. Protein Quality and Digestibility of Sorghum in preschool children Balance Studies and plasma free amino acids. *J Nut.* 1981; 111: 1928-1936.
- Mariscal-Landín G, Avellaneda JH, Reis de Souza TC, Aguilera A, Mar B. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2004; 117: 245-264.
- Mariscal-Landin G y Reis de Souza T. Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein. *Arch. Anim. Nutr.* 2006; 60: 454-466.
- Mazhar H y Chandrashekar A. Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness. *J. Cereal Sci.* 1995; 21: 155-162
- Mehansho H, Clements S, Sheare BT, Smith S, Carlson DM. Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 4418-4423.
- Mitaru BN, Reichert RD, Blair R. Improvement of the nutritive value of high tannin sorghums for broiler chickens by high moisture storage. *Poult. Sci.* 1983; 62: 2065-2072.
- Mitaru BN, Reichert RD, Blair R. Protein and amino acid digestibilities for chickens of constituted and boiled sorghum grain in tannin contents. *Poult. Sci.* 1985; 64: 101-106.
- Mitaru B, Reichert R, Blair R. Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatment of high tannin sorghum. *J. Food Sci.* 1984; 49: 1566-1568.
- Montagne L, Toullec R, Lallès JP. Intestinal digestion of dietary and endogenous proteins along the small intestine of calves fed soybean or potato. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 2719-2730.
- Moughan PJ, Rutherford SM. A new method for determining digestible reactive lysine in foods. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 2202–2209.
- Moughan PJ. AA digestibility and availability in food and feedstuffs. In Ball RO editor. *Digestive Physiology in Pigs. Proc. 9th Intl. Symp. Vol. 1.* Univ. Alberta, Alberta, Canada. 2003.199–221
- Mosenthin R, Sauer WC, Blank R, Huisman J, Fan MZ. The concept of digestible AA in diet formulation for pigs. *Livest. Prod. Sci.* 2000; 64: 265–280.

Nahrstedt A. The significance of secondary metabolites for interactions between plants and insects. *Planta Med.* 1989; 55: 333-338.

Nelson TS, Stephenson EL, Burgos A, Floyd J, York JO. Effect of tannin content and dry matter digestion on energy utilization and average amino acid availability on hybrid sorghum grains. *Poult. Sci.* 1975; 54: 1620-1623.

Nissen S. Modern methods in protein nutrition and metabolism. Academic press. Inc. San Diego. 1992. 90-120.

NRC. 1998. Nutrient requirements of swine. 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC.

Nyachoti CM, de Lange CFM, Schulze H. Estimating endogenous amino acid flows at the terminal ileum and true ileal amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs using the homoarginine method. *J. Anim. Sci.* 1997; 75: 3206-3213.

Nyannor EKD, Adedokun SA, Hamaker BR, Ejeta G, Adeola O. Nutritional evaluation of high-digestible sorghum for pigs and broiler chicks. *J. Anim. Sci.* 2007; 8: 196-203.

Oria DL, Hamaker BR, Shull JM. Resistance of alpha beta and gamma kafirins to pepsin digestion. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 2148–2153.

Oria MP, Hamaker BR, Axtell JD, Huang CP. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *PNAS.* 2000; 97: 5065–5070.

Osman RO, Abd El Gellil FM, El-Noamany HM, Dawood MG. Oil content and fatty acid composition of some varieties of barley and sorghum grains. *Grasas y aceites.* 2000; 51: 3: 157-162.

Price ML, Steve VS, Butler LC. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 1978; 26: 1214–1218.

Ramírez RE, Anaya EAM, Mariscal LG. Predicción de la composición química del grano de sorgo mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). *Tec. Pecu. Méx.* 2005; 43 (1): 1-11.

Reis de Souza TC, Mar BB, Mariscal LG. Canulación de cerdos posdestete para pruebas de digestibilidad ileal: Desarrollo de una metodología. *Tec. Pecu. Méx.* 2000; 38: 143-150.

Rom DL, Shull JM, Chandrashekar A, Kirleis AW. Effects of cooking and treatment with sodium bisulfite on in vitro protein digestibility and microstructure of sorghum flour. *Cereal Chem.* 1992; 69: 178–181.

Rooney LW y Miller FR. Variation in the structure and kernel characteristics of sorghum. In: *Proceedings of the International Symposium on Sorghum Grain Quality*, Oct. 1982; 28-31.

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

Rostagno HS, Featherston WR, Rogler JC. Studies on the nutritional value of sorghum grains with varying tannin content for chicks. *Growth studies. Poult. Sci.* 1973; 52: 765-772.

Rutherford SM, Moughan PJ. Guanidination of lysine in selected dietary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1990; 38: 209-211.

SAGARPA, 2009. SAGARPA Pagina principal. Disponible: www.sagarpa.gob.mx . Consultada Agosto 2009.

SAS. 1990 SAS/STAT User's Guide (Version 6, 4th Ed.). Cary NC: SAS Inst Inc.

Sauer WC, Ozimek L. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. A review. *Livest. Prod. Sci.* 1986; 15: 367-370.

Seckinger HL, Wolf MJ. Sorghum ultrastructure as it relates to composition. *Cereal Chem.* 1973; 50: 455-358

Serna-Saldivar S, Rooney LW. Structure and chemistry of sorghum millets. In Dendy DAV. Editor. *Sorghum and Millets. Chemistry and Technology.* American Association of cereal Chemists: St.Paul, MN. 1995; 69-124

Sève B, Henry Y. Protein utilization in non-ruminants en *Protein Metabolism and Nutrition, Proc. 7th Intl. Symp., Vale de Santarèm, Portugal.* 1996; 59-82

Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2009; 53 (2): S310-329.

Shewry RP, Naiper AJ, Tatham SA. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant. Cell.* 1995; 7: 945-956.

Schulze H, van Leeuwen P, Verstegen MWA, Van den Berg JWO. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous flow in pigs. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 441-448.

Shull JM, Chandrashekar A, Kirleis AW, Ejeta G. Development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) *Moench*) endosperm protein in varieties of varying hardness. *Food Structure*1. 1990; 9: 253-267.

Shull JM, Watterson JJ, Kirleis AW. Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (*L. Moench*) based on molecular weight, solubility and structure. *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39: 83-87.

- Shull JM, Watterson JJ, Kirleis AW. Purification and immunocytochemical localization of kafirins in *Sorghum bicolor* (L. Moench) endosperm. *Protoplasma*. 1992; 171: 64–74.
- Simon O, Bergner H, Partridge I. G. Estimation of the endogenous N proportion in ileal digesta and faeces in ¹⁵N labelled pigs. *Arch Anim. Nutr.* 1987; 10: 851–857.
- Souffrant WB, Rérat A, Laplace JP, Darcy-Vrillon B, Köhler K, Corring T, Gebhardt G. Exogenous and endogenous contribution to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed casein diet. III. Recycling of endogenous nitrogen. *Reprod. Nutr. Dev.* 1991; 33: 373-382.
- Stein HH, Pedersen C, Wirt AR, Bohlke RA. Additivity of values for apparent and standardized ileal digestibility of AA in mixed diets fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 2005; 83: 2387–2395.
- Stein HH, Sève B, Fuller MF, Moughan PJ, de Lange C.F.M. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: 172-180.
- Sunitha RK, Chandrashekar A, Shetty HS. Proteins in developing sorghum endosperm of sorghum that may be involved in resistance to grain molds. *J. Science of Food Agric.* 1992; 60: 275–282.
- Taylor JRN, Schüssler L, Liebenberg N.v.d.W. Protein body formation in the starchy endosperm of developing *Sorghum bicolor* (L.) *Moench* seeds. *S. Afr. J. Bot.* 1986; 51: 33–40.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Of Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76: 4250-4354.
- USDA, 2009. USDA HOME PAGE. Disponible: <http://usda.gov>. Consultada agosto 2009.
- Van Soest PJ, Robertson J, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 1991; 74: 3583 – 3594.
- Verbruggen MA, Beldman G, Voragen AGJ, Hollemans M. Water-unextractable cell wall material from sorghum: isolation and characterization. *J. Cereal Sci.* 1993; 17: 71-82.
- Vivas NE, Waniska RD, Rooney LW, Effect on proteins in sorghum, maize and pearl millet when processed into acidic and basic to. *Cereal Chem.* 1992; 69: 673–676.
- Ward TL, Southern LL. Sorghum amino acid supplemented diets for the 50- to 100-kilogram pig. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 1746-1753.
- Watson SA. Corn and sorghum starches: Production en: *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed. R. L. Whistler, J. W. BeMiller and E. F. Paschall, eds. Academic Press: Orlando, FL. 1984; 417- 468

Williamson MP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 1994; 297: 249-260.

Wong JH, Lau T, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel HW, Hurkman WJ, Wilson JD, Lemaux PG, Buchanan BB. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 2009; 49: 73–82

Youssef AM. Extractability, fractionation and nutritional value of low and high tannin sorghum proteins. *Food Chem.* 1998; 63: 325-329.

Zhang G, Hamaker BR. Low α -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chem.* 1998; 75: 710–713.