

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACION
RUMINAL CON DIETAS RICAS EN MIEL DE CAÑA

MARIA TERESA AGUILAR ORTEGA

Q U I M I C O

1 9 7 5



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.

Presidente: Francisco Fernández Moriega.
Vocal: Guadalupe Vélez Pratt.
Secretario: Gustavo Viniegra González.
1er. Suplente: Alfredo Echegaray Alemán.
2o. Suplente: Oscar H. Galván Félix.
Jurado asignado originalmente según el tema.

Sitio donde se desarrolló el Tema: Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Sustentante: María Teresa Aguilar Ortega.
Asesor del Tema: Gustavo Viniegra González.

A la memoria de mi Padre,
Sr. Felipe Neri Aguilar Tamayo

Con infinito amor a mi Madre,
Sra. Elda Ortega Vda. de Aguilar.

A mi Esposo Héctor, con inmensa gratitud
por su apoyo y estímulo

A mis hermanos Isabel, Felipe
y Alejandro

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Gustavo Viniegra G. por la dirección y-orientación que me brindó a lo largo de este trabajo. También al Q.F.B. Pablo Pérez Gavilán por su valiosa ayuda.

Asimismo agradezco a la Comisión Nacional de la Industria Azucarera su patrocinio y a la Empacadora Xalostoc su cooperación respecto a las muestras de líquido ruminal.

INDICE

| | Pág. |
|---|------|
| 1. Introducción. | 1 |
| 2. Antecedentes. | 5 |
| 2.1 Generalidades acerca de los rumiantes. | 5 |
| 2.2 Anatomía y Fisiología del rumen. | 5 |
| 2.3 Producción de los Acidos Grasos Volátiles en el rumen. | 9 |
| 2.4 Utilización de los Acidos Grasos Volátiles por el rumiante. | 13 |
| 2.4.1 El ciclo de Krebs en el metabolismo de los rumiantes. | 15 |
| 2.5 La melaza de caña como alimento para ganado. | 16 |
| 2.6 Tipos de melaza y su composición. | 17 |
| 2.7 Aspectos históricos de la alimentación con melaza. | 18 |
| 2.8 Sistema cubano de engorda de ganado con dietas a base de melaza de caña. | 20 |
| 2.9 Comparación de los patrones de fermentación ruminal obtenidos con dietas convencionales y dietas de melaza. | 24 |

| | Pág. | |
|--------|--|----|
| 2.10 | Efectos de las dietas ricas de melaza sobre la microflora del rumen. | 28 |
| 2.11 | Cambios fisiológicos y bioquímicos en el tracto gastrointestinal causados por la melaza. | 28 |
| 2.12 | Toxicidad de la melaza; trastornos metabólicos. | 30 |
| 2.13 | Técnicas <u>in vitro</u> para el estudio de la fermentación ruminal. | 31 |
| 2.14 | Análisis por Cromatografía de Gases. | 33 |
| 2.14.1 | El efecto de Adsorción. | 36 |
| 2.14.2 | Análisis cuantitativo de ácidos grasos volátiles. | 37 |
| 3. | Material y Métodos. | 39 |
| 3.1 | El inóculo. | 39 |
| 3.2 | Descripción del aparato para la fermentación continua. | 39 |
| 3.3 | Material empleado para la incubación a corto plazo. | 41 |
| 3.4 | Composición de la saliva artificial. | 41 |
| 3.5 | Engorda de novillos con melaza. | 41 |

| | Pág. | |
|-------|---|----|
| 3.5.1 | Técnica de muestreo. | 42 |
| 3.6 | Preservación de las muestras. | 42 |
| 3.7 | Preparación de las muestras. | 43 |
| 3.8 | Determinación cromatográfica de los ácidos grados. | 43 |
| 3.9 | Condiciones experimentales. | 44 |
| 3.10 | Determinación de alcohol. | 45 |
| 3.11 | Nitrógeno total, Soluble, Insoluble, Volá- til y uréico. | 45 |
| 3.12 | Reductores totales. | 47 |
| 4. | Resultados experimentales e interpretación. | 48 |
| 4.1 | Fermentación espontánea de melaza con mi- croorganismos ruminales. (Sin controles) | 48 |
| 4.2 | Fermentación de melaza por microorganismos ruminales a pH controlado. | 54 |
| 4.3 | Fermentación de diversas fracciones de con- tenido ruminal con diferentes sustratos. | 59 |
| 4.4 | Fermentación continua de miel, urea y ami- noácidos por microorganismos ruminales. | 62 |
| 4.5 | Resultados de la engorda de novillos con - melaza. | 66 |
| 5. | Discusión. | 68 |

| | Pág. |
|------------------|------|
| 6. Conclusiones. | 72 |
| Lista de tablas. | 74 |
| Bibliografía. | 75 |

1. Introducción.

El problema de la alimentación del ganado en los -- países de las regiones tropicales, especialmente durante -- la época de sequía, ha provocado la búsqueda de nuevas téc-- nicas de alimentación, además de las convencionales. En Mé-- xico, la melaza de caña como fuente económica de energía -- para el ganado, ha estado adquiriendo mucha importancia.

La caña de azúcar es un pasto tropical que tiene -- más eficiencia que los pastos de las regiones templadas pa-- ra convertir la energía solar a carbohidratos solubles -- (50), y además tiene un rendimiento muy elevado por hectá-- rea, como se puede apreciar en la siguiente tabla.

Rendimientos por Hectárea en Toneladas Métricas de--
Tabla I las Cosechas Productoras de Carbohidrato en Países--
Tropicales. (22).

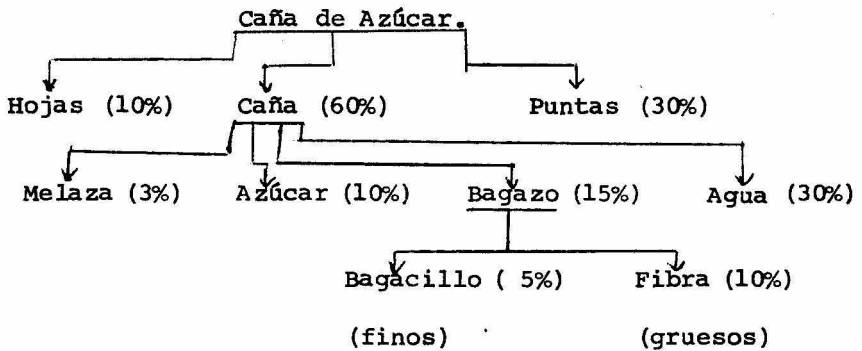
| | Maíz | Sorgo | Tubérculos de Yuca | Melaza + (mielrica) |
|---------|------|-------|--------------------|---------------------|
| México | 0.96 | 2 | 0.4 | 7.48 |
| Jamaica | 0.96 | — | 1.24 | 8.28 |
| Ecuador | 0.4 | — | 2.35 | 8.28 |
| India | 0.8 | 0.14 | | 5.72 |

+ Suponiendo que 100 Toneladas de caña producen 18.4 Toneladas de miel rica.

Desde este punto de vista, la productividad de la caña de azúcar es cuatro veces mayor que la del mejor de los granos de cereal. Debido a este enorme potencial para producir carbohidratos, se pensó en usarla como fuente de energía para el ganado.

En la siguiente tabla se explica la composición de la caña de azúcar.

Tabla II Productos y Subproductos de la Caña. (22)



En México la Secretaría de Agricultura y Ganadería en su Plan Agrícola Ganadero y Forestal de 1968, fijó la meta de sembrar 459 233 Hectáreas de caña de azúcar. De aquí se espera una cosecha de treinta millones de toneladas de caña. La tonelada de caña tiene un rendimiento de 90 a 100 Kg. de azúcar, la cual a su vez, rinde un 40% de

melaza, por lo cual se tendrán de trescientas a seiscientas mil toneladas de melaza disponibles para alimentación de ganado.

El sistema de engorda de ganado basado en miel de caña es de importancia porque el costo de los carbohidratos de la miel es menor que el de los granos, pero puede ser difícil de llevar a cabo porque surgen anomalías en la digestión y metabolismo del rumiante, hasta el grado de poner en evidencia una condición metabólica anormal a la cual no se había concedido importancia anteriormente: la toxicidad de la melaza. (15,5,35,50).

Esta enfermedad origina que los animales alimentados con altos niveles de melaza, reduzcan su eficiencia de conversión alimenticia y lleguen a perder peso en forma alarmante y a la intoxicación total. La mortalidad es alta y los animales se recuperan gradualmente al cambiar a dieta de forraje o granos. Se ha atribuido esta condición a cambios en el pH del rumen (48) y a la disminución del ácido propiónico (35), el cual es glucogénico y la importancia del cual se explicará más adelante.

El objetivo de esta tesis es estudiar los patrones-

de fermentación ruminal in vivo e in vitro de la melaza; - correlacionarlos con la intoxicación que produce este alimento, y tratar de lograr un patrón de fermentación anaerobia estable in vitro, similar al de animales de alta productividad.

2. Antecedentes.

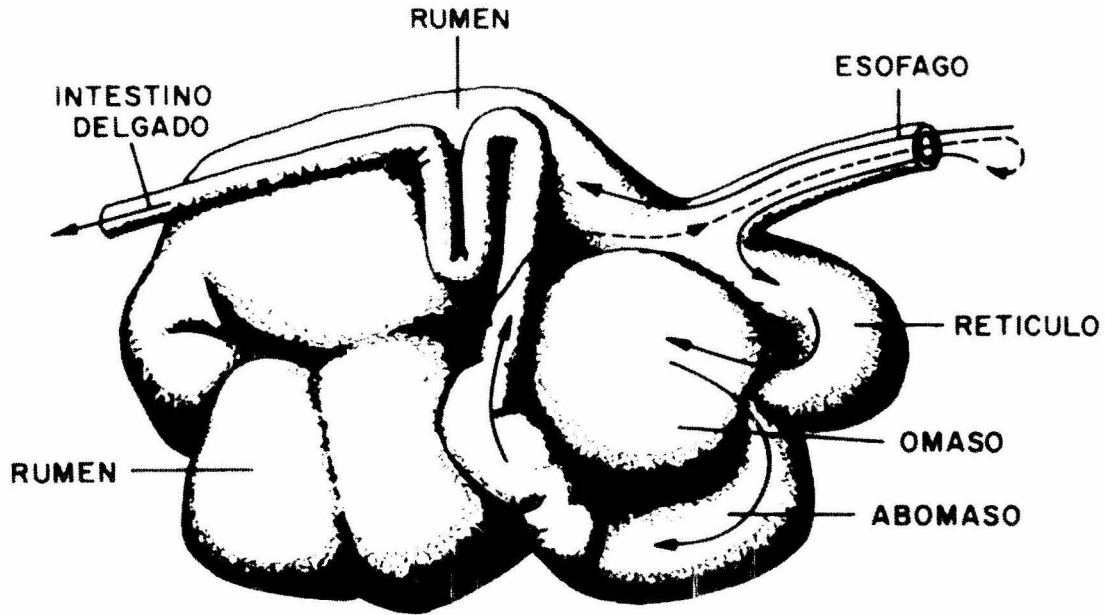
1.2 Generalidades acerca de los rumiantes.

El rumiante es un animal que puede consumir alimentos que para el hombre son indigeribles, tales como: celulosas y nitrógeno no protéico, y convertirlos en productos muy valiosos como son la carne y la leche. Estos animales se caracterizan por tener el tracto digestivo anterior al duodeno dividido en varios compartimientos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. Los dos primeros sirven como cavidad de fermentación intermitente; en el omaso se lleva a cabo la absorción de agua y nutrientes hidrosolubles y en el abomaso se efectúa la digestión péptica.

2.2 Anatomía y Fisiología del rumen.

El desarrollo considerable del rumen se lleva a cabo durante el primer año de vida del animal y se atribuye a la ingestión de sólidos. Pasado el primer año, el rumen representa el 80 % del estómago y en los bovinos alcanza una capacidad de 100 a 200 litros (3).

FIG. 1 ESQUEMA DEL TRACTO DIGESTIVO DE
LOS RUMIANTES.



El rumen está revestido por un epitelio en el que se desarrollan papilas, las cuales aumentan la superficie de contacto para la absorción de metabolitos. Para que las papilas se desarrollen normalmente, es necesario que el animal ingiera sustancias de rápida fermentación, tales como el pasto y los concentrados. Los ácidos grasos volátiles (AGV) que provienen de la fermentación, son los nutrientes que satisfarán un 80% de las necesidades energéticas del animal (2).

Durante el período de crecimiento se establece en el rumen una población de bacterias y protozoarios. Los protozoarios provienen de inoculación con otros animales y las bacterias se introducen con el agua y los alimentos. Existen alrededor de 10^6 protozoarios por gramo de contenido ruminal y 10^{10} bacterias por gramo (3). La dieta es la que determina qué organismos se hallarán presentes y en qué proporción. Estos microorganismos viven en simbiosis con su huésped y también entre ellos mismos (24).

El rumen se considera como una cámara de fermentación en la cual la población microbiana se encuentra

en un medio de cultivo. De acuerdo con Annison (3), las condiciones en que se encuentra el rumen son:

- 1) Temperatura de 38 a 42°C.
- 2) Sistema anaerobio muy reductor, con una atmósfera compuesta de: CO_2 , CH_4 , N_2 y H_2 .
- 3) La ingestión de alimentos provee regularmente de sustrato a los microorganismos.
- 4) Los productos finales del metabolismo de los microorganismos se remueven constantemente, por lo que no se acumulan, ni llegan a inhibir la acción enzimática.
- 5) El contenido del rumen se regula por el paso frecuente de partículas alimenticias de tamaño reducido y microorganismos hacia el omaso, a través del orificio retículo-omasal.
- 6) Para mantener el volumen líquido, el pH y la composición iónica, los rumiantes secretan gran cantidad de saliva (de 50 a 80 litros diarios), la cual es rica en bicarbonato y otros iones. El principal factor para mantener el pH, es la absorción de los ácidos grasos producidos durante la fermentación (3).

2.3 Producción de los ácidos grasos volátiles en el rumen.

El metabolismo de los carbohidratos en los rumiantes muestra diferencias notables del que se verifica en los animales monogástricos. Solamente pequeñas cantidades de carbohidratos se absorben como tales en el tubo digestivo de los rumiantes, ya que la mayoría de los carbohidratos de la dieta se fermentan en el rumen y generan los ácidos acético, propiónico y butírico principalmente, en la relación aproximada 70:20:10, y otros ácidos superiores como el valérico, pero en proporción poco significativa.

a) Acido Acético.

El ácido acético predomina en las mezclas de ácidos grasos volátiles que se encuentran en el rumen, con cualquier tipo de alimentación, y es el producto final más abundante en la fermentación de los carbohidratos por microorganismos del rumen, constituyendo alrededor del 70 % de los ácidos grasos totales (3). El mecanismo de fermentación de carbohidratos fue -

demostrado por Elsdén (16) y consta de los siguientes pasos: degradación del polisacárido a hexosa, transformación a glucosa 6-fosfato, desdoblamiento a piruvato, el cual da lugar al acetato y a una molécula de CO_2 . (ver figura II a).

b) Acido Propiónico.

La producción de ácido propiónico por microorganismos del rumen fue estudiada por Johns (27), quien demostró que se formaban propionatos a partir de lactatos por un mecanismo de fijación de CO_2 . Después de esta reacción, el oxaloacetato se transforma sucesivamente en malato, fumarato y succinato. Este último sufre descarboxilación y da lugar al propionato y a una molécula de CO_2 . (ver figura II b).

c) Acido butírico y ácidos grasos superiores.

El origen del butirato y los ácidos grasos superiores en el rumen, fue estudiado por Ladd (30), quien incubó D 1,2-Lactato marcado con carbono 14, con el contenido del rumen, y examinó la distribución de

radiactividad en los ácidos que se formaron. Las --
ecuaciones de la figura II c, indican la formación-
de ácidos grasos a partir de lactato marcado.

Por lo tanto, el lactato aparece como un precursor-
clave en la producción de los ácidos grasos del ru-
miente, especialmente del propionato y el butirato.

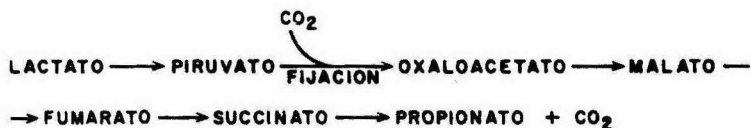
FIG. 2 PRODUCCION DE LOS ACIDOS GRASOS VOLATILES EN EL RUMEN.

a. PRODUCCION DE ACIDO ACETICO

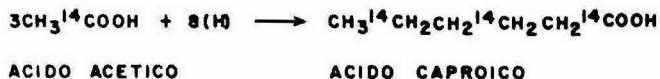
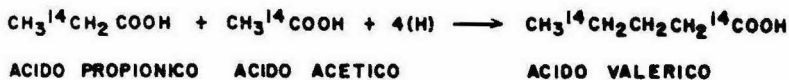
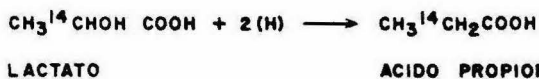
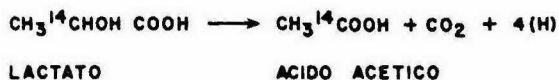


²C₆ REPRESENTA CUALQUIER HEXOSA.

b. PRODUCCION DE ACIDO PROPIONICO



c. PRODUCCION DE ACIDO BUTIRICO Y ACIDOS GRASOS SUPERIORES



2.4 Utilización de los Acidos Grasos Volátiles por el Rumiante.

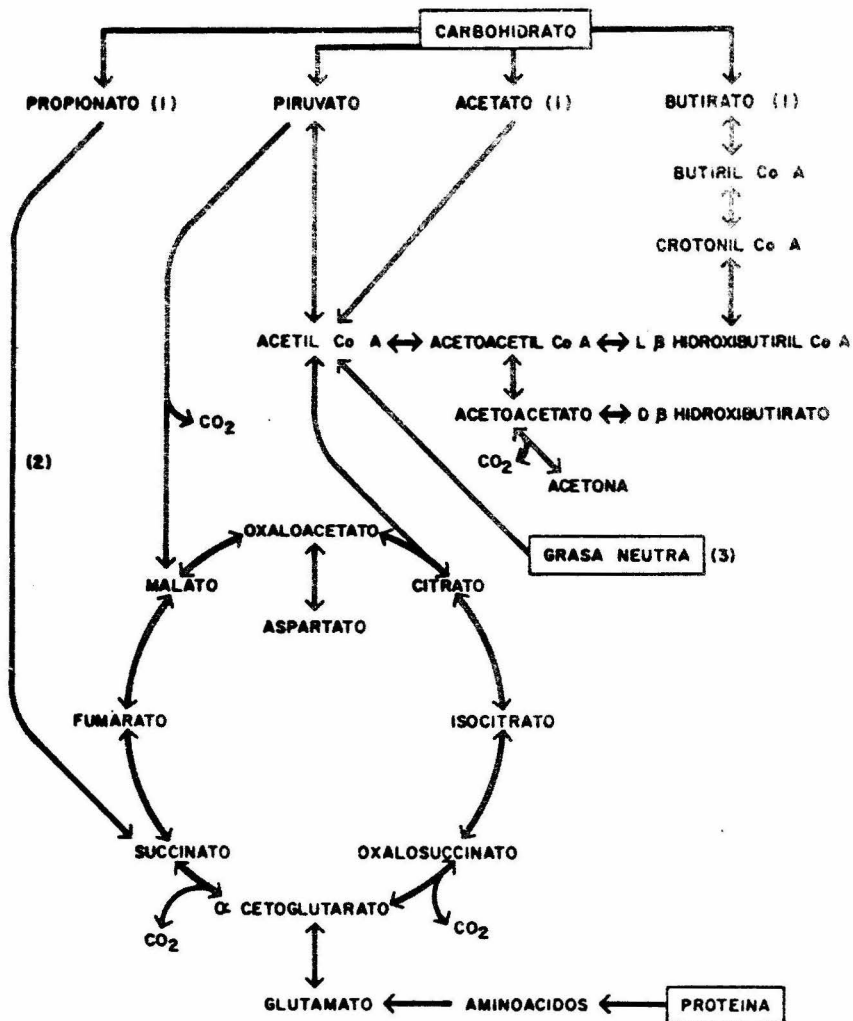
Los ácidos grasos volátiles producidos en el rumen proporcionan un 70 u 80 % de la energía requerida por el animal (32). El acetato se utiliza para la oxidación en los tejidos extrahepáticos, especialmente en los músculos y en el corazón. También se emplea para la síntesis de grasas (lipogénesis) en el tejido adiposo (28).

Prácticamente todo el propionato y butirato absorbidos son retirados por el epitelio del rumen y por el hígado antes de entrar a la circulación general de la sangre (47). El propionato es glucogénico y el butirato es cetogénico (46). Algo del butirato se convierte a cuerpos cetónicos en el epitelio del rumen durante la absorción (45).

Por consiguiente, es el ácido propiónico la fuente principal de glucosa y de glucógeno hepático en el rumiante. La otra fuente importante de glucosa es la proteína, ya que la mayoría de los aminoácidos son glucogénicos (31).

La utilización de los ácidos grasos volátiles por -
los tejidos de los rumiantes, debe examinarse en re
lación con el ciclo de Krebs, que se esquematiza en
la figura III.

FIG. 3 CICLO DE KREBS EN EL METABOLISMO DE LOS RUMIANTES. (29)



(1) PRODUCIDOS POR FERMENTACION EN EL RUMEN.

(2) VIA DEMOSTRADA EN EL EPITELIO DEL RUMEN (46)

(3) EL GLICEROL ORIGINADO POR DESINTEGRACION DE LA GRASA NEUTRA, ES METABOLIZADO POR VIA GLUCOLITICA (7).

2.5 La melaza de caña como alimento para ganado.

Los sistemas tradicionales de engorda de ganado -- ha tenido como fuente principal de energía al forraje y/ó -- los granos de cereal. La posibilidad de usar carbohidratos-solubles de caña para producción de carne de ganado vacuno-en los trópicos fue sugerida por primera vez por Preston y-Hagelberg (51), motivada por la escasez de granos y abundan-cia de melaza de caña en Cuba.

Desde entonces se han elaborado sistemas de ali-mentación utilizando melaza a niveles hasta de un 80% y se-ha demostrado que dan resultados fundamentalmente compara-bles al uso de cantidades equivalentes de grano cereal, --- (52,53).

Debido a que se utilizan niveles cercanos al 80%-de melaza en este tipo de dieta, es interesante estudiar el metabolismo de esta fuente de carbohidratos. Estudios pre-vios sugieren que el patrón de fermentación es "anormal" -- (diferente al que se obtiene con dietas convencionales), la concentración de ácidos grasos volátiles más baja, y el pH-más alto (39)

2.6 Tipos de melaza y su composición.

La composición de la melaza de caña varía ligeramente, dependiendo de la fase del proceso de la cual proviene. (50) El zumo resultante de exprimir la caña se denomina guarapo; contiene sacarosa, azúcares reductores e impurezas (tales como gomas, ceras, bagazo, etc.)

Al clarificar el guarapo con hidróxido de calcio, filtrarlo y concentrarlo por evaporación, se obtiene la "miel rica", la cual tiene la misma composición que el guarapo, pero está libre de muchas impurezas.

Por último la "miel final", llamada simplemente melaza, contiene todos los azúcares del jugo de la caña que no pueden ser extraídos económicamente.

La melaza contiene, por consiguiente, gran cantidad de carbohidratos, pero muy pocos compuestos nitrogenados, y es muy pobre en proteínas. Contiene gran cantidad de elementos ionizables, en especial potasio y calcio (este último proviene de la clarificación con hidróxido de calcio). Tiene además trazas de todos los minerales esenciales.

2.6.1 Composición de la Melaza proveniente de Diversos Países. (22). Tabla III.

| | Cuba | Uganda | E.U.A. | Filipinas |
|--------------|-------|--------|--------|-----------|
| Sacarosa % | 45.2 | ----- | 74.1 | 37.6 |
| Reductores % | 22.1 | ----- | 21.3 | 27.0 |
| N x 6.25 % | 4.4 | 4.2 | 5.0 | 4.5 |
| Ceniza % | 7.2 | 8.6 | 9.7 | 10.8 |
| Ca % | 0.92 | 0.71 | 0.82 | ---- |
| P % | 0.08 | 0.07 | 0.09 | ---- |
| K % | 2.6 | ---- | 3.17 | ---- |
| Na % | 1.08 | ---- | 0.23 | ---- |
| Mg % | 0.59 | ---- | 0.47 | ---- |
| S % | ----- | ---- | 0.46 | ---- |

2.7 Aspectos Históricos de la Alimentación con Melaza.

El primer uso que se dió a la melaza fue como suplemento y vehículo para nitrógeno no protéico en ganado -- alimentado con forraje de mala calidad. Para este propósito se usa en forma líquida y en una proporción que no exceda -- al 20% (41).

Otro uso que se ha dado a la melaza es como agen-

te de palatabilidad y para dar consistencia a los concentrados, en proporciones que no excedan al 15 % (61,32,33)

Se ha observado que a medida que aumenta el nivel de melaza en la dieta, disminuyen los aumentos diarios en peso y la eficiencia alimenticia (40). De hecho, con niveles de melaza por encima del 20%, el valor numérico de la conversión alimenticia tiende a empeorar (23).

También se ha comprobado que la eficiencia de utilización de la energía de la melaza en raciones con alto contenido de forraje es buena hasta niveles del 30% pero tiende a disminuir bruscamente con niveles del 40% (59).

Por lo que respecta a la energía neta que aporta la melaza, cuando ésta se halla presente hasta un 15% la energía permanece uniforme, pero al aumentar por encima de este valor, la energía neta aportada disminuye (32,33).

A pesar de todos estos inconvenientes, una comparación económica entre la melaza y los granos de cereal indica que la primera es mucho menos costosa (en mayo de 1975, el precio de garantía del maíz era de \$ 1,750.00 con 70% de almidón, y el de la melaza de \$ 520.00 con 50% de azúcares).

De ahí surge el interés en incluir altos niveles de melaza en las raciones. Es en Cuba donde se desarrolló un sistema de engorda en el que la melaza proporciona la energía de la dieta, encontrándose en proporciones del 70 al 80% y como sustituto del grano (50).

2.8 Sistema Cubano de Engorda de Ganado con Dieta a Base de Melaza de Caña.

En este sistema la melaza se proporciona al animal en forma líquida, separada de los otros componentes de la ración.

Se le agrega un 4 % de urea, pues se ha determinado que el consumo voluntario de melaza aumenta cuando el contenido de urea se eleva de 0 a 4 %, pero más allá de esta concentración, el consumo disminuye marcadamente o lentamente, dependiendo de que el otro componente de la dieta sea forraje o grano (50).

El contenido de forraje es del 15 %. El forraje también influye en el consumo voluntario de la melaza, no sólo por su naturaleza física, que estimula los movimientos del rumen, sino también por sus propiedades y composición.-

Estudios comparativos entre forraje fresco, deshidratado, finamente molido y sintético (plástico), señalan que el primero da mejores resultados, y el consumo máximo se logra cuando el forraje representa el 15% del material digerible de la dieta (35,5).

Se proporciona 9.59 unidades de energía metabolizable por día en forma de proteína verdadera, (un Kg de material digerible contiene 3.616 Mcal de energía metabolizable), preferentemente harina de pescado, ya que la melaza es muy pobre en proteína y este factor la hace radicalmente distinta a las dietas de forraje o de cereales, las cuales, además de proporcionar energía, aportan también proteínas (49).

Con dietas de melaza, los animales deben tener acceso a ella durante todo el día, pues con esto, el consumo voluntario aumenta un 100%, comparado con el caso en que tengan acceso a la melaza solamente dos veces al día (50).

Además, para que el animal coma gran cantidad de melaza, es necesario restringir los otros componentes de la ración (48). En este sistema, el carbohidrato de la melaza da el 80% de la energía total metabolizable de la die

ta y el nitrógeno de la urea se incluye para suplir la deficiencia protéica, proporcionando un 60% del requerimiento total de nitrógeno del animal.

Este plan entró en vigor en Cuba desde Octubre - de 1969 y ha ayudado a mejorar la productividad de carne - bovina como se puede observar en los datos de la siguiente tabla.

TABLA IV. Comparación de un lote de 10,000 cabezas de ganado cubano de engorda con dieta basada en melaza - - - (1970-71) y basada en forraje (1969). (42).

| | Forraje | Melaza | |
|------------------------|---------|--------|--------|
| | 1969 | 1970 | 1971 |
| Ganancia Diaria Total | | | |
| en peso vivo (Kg) | 3724 | 8295 | 13,977 |
| Ganancia diaria en pe- | | | |
| so vivo (Kg) por toro | 0.43 | 0.88 | 0.89 |
| Conversión: Kg/Kg ga- | | | |
| nancia en peso vivo: | | | |
| Forraje (fresco) | 34.7 | 11.9 | 10.3 |
| Melaza | 3.1 | 10 | 9.62 |
| Urea | 0.23 | 0.32 | 0.31 |
| Concentrado | 3.84 | ---- | ---- |
| Harina de pescado | ---- | 0.41 | 0.41 |
| Minerales | ---- | 0.13 | 0.1 |
| Materia Seca | 15.4 | 10.8 | 9.82 |
| Mortalidad % | 0.1 | 1.0 | 0.21 |
| Sacrificio de emer | | | |
| gencia | 0.4 | 3.04 | 1.31 |

2.9. Comparación de los Patrones de Fermentación Ruminal obtenidos con Dietas Convencionales y Dietas de Melaza.

Existen datos acerca de la fermentación en el rumen cuando la dieta está constituida esencialmente por melaza.- En la siguiente tabla se muestran las proporciones relativas de los ácidos grasos volátiles producidos en terneros, ganado de engorda y vacas lecheras. Se observa incremento en la producción de ácido butírico a expensas de los ácidos acético y propiónico.

TABLA V. Composición Molar de los Acidos Grasos Volátiles en el líquido ruminal de Ganado Alimentado con niveles altos de Melaza, comparados con valores de la Literatura para Dietas Convencionales. (39)

| Clase y No. de animales | Dieta | AGV.TOT. µM/l | Proporciones molares% | | | |
|----------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|---------|----------|-------|
| | | | + A | ++ P | +++ B | Otros |
| <u>Vacas lecheras</u> | | | | | | |
| 2 | Pastura | 131 | 65 | 18 | 11 | 3 |
| --- | Granos | 148 | 58 | 20 | 15 | 4 |
| 8 | Melaza | 114 | 36 | 24 | 29 | 10 |
| <u>Ganado de Engorda.</u> | | | | | | |
| 2 | Heno de Alfalfa | 107 | 72 | 18 | 7 | |
| 5 | Granos | 115 | 39 | 40 | 21 | |
| 8 | Melaza | 143 | 31 | 19 | 41 | 9 |
| <u>Becerras de destete</u> | | | | | | |
| 4 | Granos | 115 | 50 | 37 | 13 | |
| 8 | Melaza | 96 | 48 | 20 | 37 | 14 |

+ Acido acético

++ Acido Propiónico

+++ Acido Butírico.

Se puede afirmar que el patrón de fermentación obtenido con dietas de melaza es muy diferente del patrón de fermentación considerado normal, con dietas de forraje o de concentrado. Esta diferencia fue ratificada por Elías (1971), quien trabajó con un grupo de becerros de destete, a los que alimentó con este tipo de dietas. Los datos obtenidos se reportan en la siguiente tabla. (Tabla VI).

TABLA VI Fermentación ruminal con dietas basadas en Grano, Forraje, o melaza. (15)

| | Cereal (1) | Forraje (2) | Melaza (3) |
|--------------------------------------|------------|-------------|------------|
| No. de becerros | 4 | 3 | 4 |
| pH | 6.16 | 7.1 | 6.66 |
| Acidos grasos volátiles totales pM/l | 157 | 82 | 132 |
| Acético | 44.9 | 76.2 | 49.7 |
| Propiónico | 42.7 | 15.2 | 21.3 |
| Butírico | 5.83 | 7.46 | 25.7 |
| Isobutírico | 1.38 | 0.41 | 0.3 |
| Valérico | 2.24 | 0.29 | 2.81 |
| Isovalérico | 2.03 | 0.39 | 0.26 |
| Caprónico | 0.73 | ---- | 0.79 |

- (1) Maíz molido y cáscara de avena, cada uno proporcionando 40% de la materia digerible de la dieta.
- (2) Heno de baja calidad.
- (3) Aproximadamente el 80% de la dieta fue melaza y el 15% pasto seco.

También se ha estudiado la fermentación ruminal variando las proporciones de melaza/maíz desde 8:63 hasta 61:0. La proporción de ácido valérico aumentó en un 480%, el butírico en 130%, el propiónico disminuyó en un 48% y el acético en 10%.

TABLA VII. Efectos en la Fermentación ruminal al sustituir Maíz por melaza en una dieta baja en Forraje para vacas Lecheras. (55).

| | Maíz / melaza (como % de materia digerible) | | | |
|-----------------------------------|---|-------|-------|------|
| | 63:8 | 42:25 | 20:45 | 0:61 |
| AGV. % Molar. | | | | |
| Acético | 57.4 | 56.8 | 55.8 | 51.9 |
| Propiónico | 29.3 | 23.9 | 19.9 | 18.0 |
| Butírico | 10.7 | 17.6 | 21.1 | 25.8 |
| Valérico | 0.6 | 1.2 | 2.6 | 3.7 |
| Cuerpos Cetónicos en la sangre | | | | |
| Mg/100 ml | 4.6 | 3.9 | 4.9 | 7.0 |

2.10 Efecto de las Dietas Ricas en Melaza sobre la Microflora del Rumen.

Elías ha estudiado los cambios que ocurren en la población microbiana del rumen cuando la melaza es el constituyente principal de la dieta, comparada con una dieta de concentrados. (15). Observó que predominaban organismos nuevos que nunca antes habían sido aislados del contenido ruminal.

Estas especies se caracterizan por producir muy poco o nada de ácido propiónico, y principalmente ácidos acético y butírico. Algunas producen cantidades significativas de etanol. Estas propiedades individuales de las bacterias, son concordantes con la naturaleza del patrón conjunto de fermentación ruminal observado.

2.11 Cambios Fisiológicos y Bioquímicos en el tracto gastrointestinal causados por la melaza.

Según Preston (50), los principales cambios son los siguientes:

- 1) Ningún azúcar escapa a la fermentación ruminal, por consiguiente el animal no obtiene glucosa por digestión post-ruminal de carbohidratos. Esto es -

un contraste con las dietas basadas en granos, - en las que algo de almidón escapa casi siempre a la fermentación ruminal, (3, 43), incluido dentro de los protozoarios.

- 2) La naturaleza de la fermentación ruminal es tal, que la proporción molar de ácido propiónico es--baja (en el rango de 10 a 20 %) y la de butírico es alta (hasta 40%).
- 3) Hay un gran volumen líquido en el rumen.
- 4) El rumen se contrae lentamente.
- 5) Hay un consumo elevado de agua.
- 6) Existe un patrón continuo de comida y bebida.
- 7) El sustrato para glucogénesis está reducido, como se observa en los incisivos (1) y (2). Además, - a nivel celular llega poca cantidad de aminoácidos (formados por síntesis microbiana a partir - de urea) y los que están presentes son de alto - valor biológico (los aminoácidos provienen de harina de pescado y proteína microbiana). Debido a

la cantidad limitada de aminoácidos, muy pocos -
podrán ser utilizados para glucogénesis.

2:12 Toxicidad de la Melaza: Trastornos Metabólicos.

La enfermedad más importante asociada con este sistema de engorda es la toxicidad de la melaza. Verdura y Zamora (60) describieron este estado como similar a la necrosis cerebrocortical (NCC).

Los síntomas son: aumento inicial en sensibilidad y pérdida de la visión, temblores musculares, falta de coordinación, salivación excesiva, tendencia a caminar en círculos. La mortalidad es baja y los animales se recuperan gradualmente al cambiar a dieta de forraje.

La NCC es producida principalmente por deficiencia de tiamina a nivel celular, sin embargo, se ha comprobado que la toxicidad de la melaza no es susceptible a este tratamiento (34). Losada y Preston han demostrado que es posible inducir la toxicidad en un 100% simplemente suprimiendo totalmente el forraje de la dieta (34). Al volver a suministrar forraje, los animales presentan mejoría inmediata.

Losada (34), explicó la toxicidad de la miel como si-

que: el primer paso que conduce al animal hacia esta condición, es que consume menos forraje del necesario y como consecuencia se reduce su consumo voluntario de melaza. Esto conduce a un aumento de pH debido a que disminuye la producción de ácidos grasos volátiles. El patrón de ácidos grasos cambia hacia una menor proporción del ácido propiónico: se han reportado valores tan bajos como el 8% molar, en animales en estado de toxicidad. En este momento la cantidad de precursores de glucosa se vuelve crítica, los animales pierden peso rápidamente debido a que tratan de obtener glucosa por catabolismo de las reservas celulares. Debido a la insuficiencia aguda de glucosa se presenta la necrosis cerebral, ya que el tejido cerebral tiene como única fuente de energía a la glucosa.

Es por lo tanto deseable conocer mejor la naturaleza de los trastornos ruminales con dietas ricas en miel de caña para proponer una solución adaptada a nuestro medio.

2.13 Técnicas in vitro para el estudio de la Fermentación Ruminal.

El Rumen es un ecosistema complejo, en el cual sería muy difícil controlar las múltiples variables e influencias

fisiológicas. Por esto, se han empleado para su estudio gran variedad de técnicas in vitro, las cuales han permitido obtener datos relativos a la degradación y síntesis de proteínas, digestión de fibras, conversión de material alimenticio en -- ácidos grasos volátiles, y otros procesos del rumen, los cuales no se hubieran podido estudiar con tanta facilidad en el animal. (Ruefener, 1963).

En los primeros experimentos in vitro, se incubó el contenido del rumen sin diluir en un recipiente de cristal, al que se agregó un sustrato y se observó la aparición de -- productos finales. Esta técnica es útil en periodos cortos de tiempo y se conoce como incubación a corto plazo. (Pearson y Smith, 1943).

Se trató de hacer un sistema más aproximado a las --- condiciones in vivo, manteniendo condiciones anaeróbicas --- (Marston, 37) y suspendiendo los gérmenes en un líquido de - pH regulado, para mantener un pH constante. Burroughs (8), - usó una muestra de contenido ruminal diluida a la mitad con solución mineral de composición semejante a la saliva. Estos métodos se conocen por el nombre de rumen artificial.

Hay que recordar, sin embargo, que en la fermentación

ruminal normal, los productos finales se remueven al pasar la ingesta a regiones más bajas del tracto digestivo y también al ser absorbidos los metabolitos por la pared del rumen. Se adiciona sustrato nuevo periódicamente y el flujo continuo de saliva (con propiedades amortiguadoras) ayuda a mantener un rango de pH fisiológicamente normal. Existen en la actualidad una nueva técnica, el cultivo continuo, - que puede imitar la mayoría de estas funciones, y de esta manera mantener un medio ambiente muy similar al del rumen (57).

Como ya se dijo, estas técnicas facilitan el estudio detallado de procesos que sería muy difícil investigar in vivo.

Si se emplean varios métodos conjuntamente y en asociación con estudios in vivo, se pueden obtener conocimientos considerables relativos a los factores que afectan a las actividades de la flora del rumen, y de esta manera se pueden proponer métodos para influenciar y mejorar la producción ganadera.

2.14 Análisis por Cromatografía de Gases.

Para analizar la fermentación microbiana se requie-

ren métodos precisos que determinen cuantitativamente los -
productos finales del metabolismo presentes en el medio. --
Los ácidos grasos volátiles son un grupo de metabolitos ---
que se encuentran bajo estas condiciones de fermentación y-
sobre los cuales vamos a concentrar nuestra atención.

Desde 1946 se empleó el método de cromatografía en -
columna para separar los ácidos grasos volátiles. Este método
fue desarrollado por Elsdén en 1946 (17) pero toma mucho
tiempo y además requiere grandes cantidades de disolventes-
orgánicos. En 1952, con el desarrollo de la cromatografía -
gas-líquido, James y Martin (25), vieron la posibilidad de-
efectuar los análisis en menos tiempo. Los ácidos grasos vol
átiles se extraían en solventes, a continuación se conver-
tían a ésteres metílicos y luego se procedía a analizarlos-
por cromatografía de gases.

La determinación directa de los ácidos grasos volátil
es libres fue de gran importancia, pues abrevió los proce-
dimientos anteriores de esterificación. El método de Gehrke
y Lamkin (21), que fue adaptado más tarde por Fenner y ----
Elliot (20) para analizar el líquido ruminal, empleaba el -
detector de conductividad térmica. La desventaja de éste, -
además de su menor sensibilidad, es que no se podía emplear

soluciones acuosas; el agua en sí no daña al detector pero ocasiona que los picos coleen exageradamente, lo cual hace imposible un estudio cuantitativo de los ácidos individuales. Por esta razón, era necesario separar los ácidos cuantitativamente de la muestra original y disolverlos en un medio apropiado, (eter etílico, hexano). El procedimiento de Fenner y Elliot consistía en recoger los ácidos en agua por medio de destilación con arrastre de vapor del líquido ruminal previamente acidificado con ácido sulfúrico. El destilado se titulaba y se hacía alcalino con hidróxido de sodio; se evaporaba a sequedad, después de lo cual, las sales de sodio se disolvían, previa acidificación, en un disolvente orgánico.

Con el advenimiento del detector de ionización de flama, surgió la posibilidad de analizar los ácidos grasos volátiles libres y en medio acuoso. Este detector, además de ser más sensible, permite examinar el líquido ruminal con relativa sencillez.

El primer análisis por cromatografía de gases de soluciones acuosas de ácidos grasos muy diluídas, fue reportado por Emery y Koerner en 1961 (18) y fue perfeccionado para un análisis de sangre y de líquido ruminal por Erwin-

y colobaradores (19).

2.14.2 El efecto de Adsorción.

La dificultad que surgió al emplear soluciones acuosas era el efecto de retención o repetición. Este fenómeno fue citado por Emery y Koerner (18), y Erwin y colaboradores (19). Se refiere a la adsorción de pequeñas cantidades de ácidos grasos cuando se inyectan soluciones acuosas de éstos a la columna. Estos componentes, que se adsorben en el soporte sólido, se remueven a la siguiente inyección y exageran los picos de la muestra. Si se inyecta agua a la columna, se obtiene un cromatograma de pequeños picos con el mismo tiempo de retención que los ácidos grasos detectados. Esta dificultad hacía imposible el análisis cuantitativo exacto.

Ackman y Burgher en 1963 (1), añadieron ácido fórmico a la corriente de gas de acarreo para evitar este efecto. Una variante a esta técnica para la eliminación de retenciones, consistió en la adición directa de ácido fórmico al líquido ruminal que va a ser analizado. Este procedimiento fue reportado por Decker (13) y después fue empleado por Carlstrom y colaboradores (9) y Cottyn (11).

La experiencia indica que una concentración del 5 % de ácido fórmico en el líquido que se va a analizar, es su ficiente para reducir la retención a un nivel insignificante. Según Carlstrom, el ácido fórmico, que entra primero a la columna, satura el soporte sólido, y hace imposible la retención de los ácidos siguientes. El grado de adsorción también depende de la naturaleza de la fase estacionaria en la columna. Hay menor adsorción en fases polares que en las no polares.

2.14.3 Análisis Cuantitativo de Acidos Grasos Volátiles.

Para la evaluación cuantitativa se han empleado dos métodos principalmente: el del standard interno y la comparación con una mezcla de composición conocida.

Cottyn empleó ácido caprónico y Carlstrom ácido isovalérico. La desventaja de este método es que a menudo existen pequeñas cantidades de ácido isovalérico y trazas ocasionales de ácidos caprónico en el líquido ruminal. Como estas cantidades son casi siempre constantes, se puede aplicar una corrección al efecto. Por la dificultad que representa escoger un standard interno no se empleó este método.

Se hizo una mezcla standard de composición aproxima-

da al líquido ruminal, conteniendo los ácidos acético, propiónico y butírico, y la concentración de los ácidos grasos volátiles individuales se obtuvo por comparación contra la mezcla estándar.

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1 El inóculo.

Para las fermentaciones in vitro se empleó líquido ruminal de una vaca fistulada, la cual fue alimentado con sorgo, rastrojo de maíz y zacamel (30 % de bagacillo y 70 % de melaza 80°Brix). Inmediatamente después de tomar la muestra, se filtró con una gasa y se tomó como inóculo para iniciar la fermentación.

3.2 Descripción del Aparato para la Fermentación Continua.

Se empleó un vaso de cristal de un litro de capacidad con tres salidas. En la tapa tenía cinco orificios, uno para el termómetro, otro para el electrodo de vidrio y el tercero con tres conexiones, la primera para agregar sustrato, la segunda para la saliva y la última para el escape de los gases producidos por la fermentación.

El líquido se hizo circular a través de una bomba peristáltica. El fermentador contenía una malla de polipropileno para la retención de fibras, con orificios de 5 mm de diámetro.

Este aparato se montó sobre un termostato con agita-

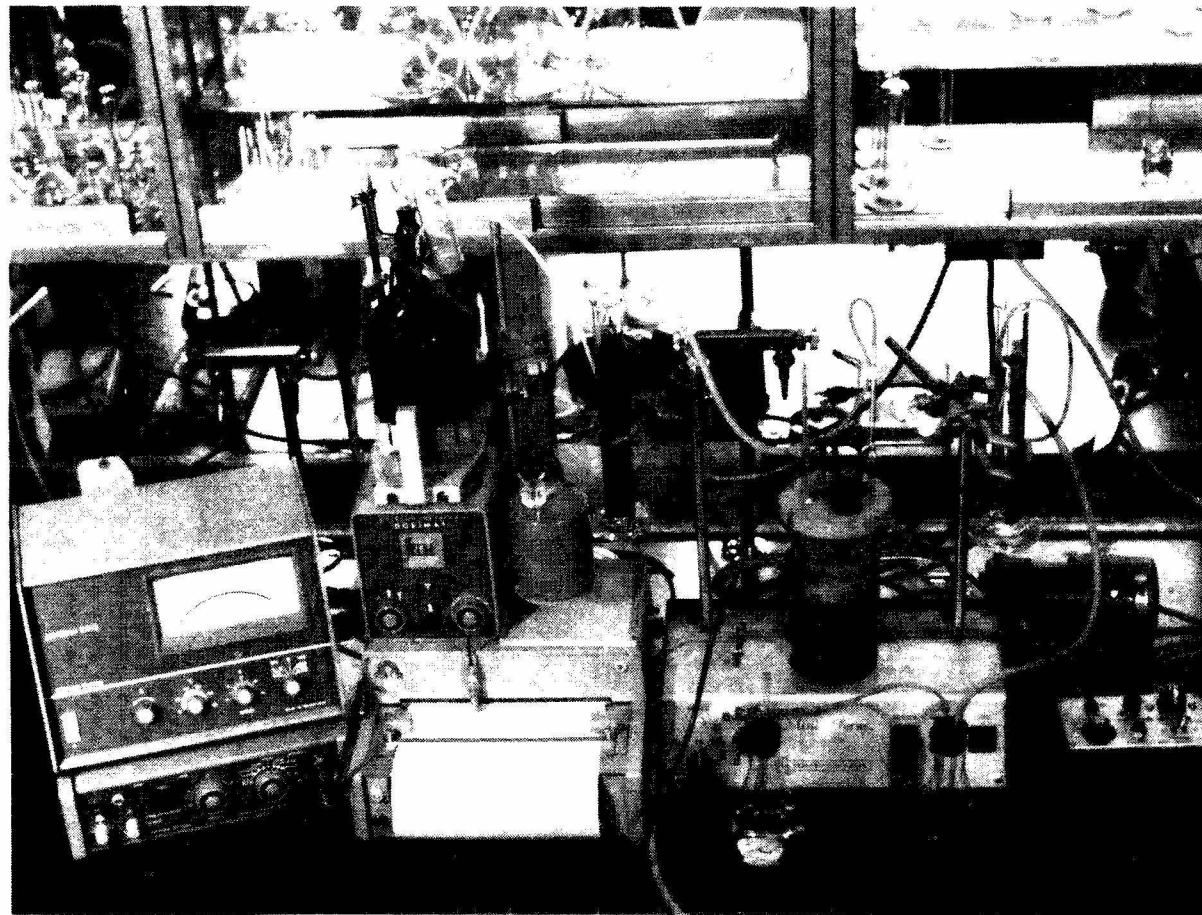


FIG. 4

dor magnético. El pH se reguló con un aparato automático de adición de álcali (pH Statt). Figura 4.

3.3 Material empleado para Incubación a Corto Plazo.

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 ml, cerrados, los cuales se colocaron en una incubadora con agitación constante y a una temperatura de 39°C.

3.4 Composición de la Saliva artificial.

Se preparó una solución de saliva artificial de composición química semejante a la del animal, y por cada 1000 ml se emplearon los siguientes compuestos:

| | |
|------------------------------------|----------|
| Bicarbonato de sodio | 8.9 gr. |
| Bifosfato de Sodio heptahidratado | 7.0 gr. |
| Cloruro de Potasio | 0.57 gr. |
| Cloruro de sodio | 0.47 gr. |
| Cloruro de Calcio | 0.04 gr. |
| Sulfato de Magnesio heptahidratado | 0.12 gr. |

3.5 Engorda de Novillos con Melaza.

En el Rancho San Miguel, estado de México, la empacadora Xalostoc llevó a cabo una engorda de novillos con miel

de caña.

Se usaron ochenta y siete novillos comerciales cruzados con cebú. Los animales fueron pesados en el momento que llegaron y se pesaron cada veintiocho días durante todo el período de engorda, que fue desde el 22 de Noviembre de - - 1973 hasta el 4 de Abril de 1974. La dieta que recibieron - consistió de:

| | |
|---------------------|------------|
| Paja de trigo | 2 Kg. |
| Grano de sorgo | 2 Kg. |
| Urea | 2 % |
| Complemento mineral | ad libitum |
| Melaza de caña | ad libitum |

3.5.1 Técnica de muestreo.

Las muestras para determinación de los ácidos grasos volátiles fueron tomadas el día de sacrificio de los animales, los cuales estaban sin ayuno. Se tomaron post mortem, - directamente, del rumen recién extirpado.

3.6 Preservación de las Muestras.

Las muestras de líquido ruminal, tanto del laboratorio como del Rancho San Miguel, se filtraron a través de --

cuatro capas de gasa para eliminar las partículas grandes y se preservaron con solución saturada de cloruro mercuríco (2 ml por cada 100 ml de líquido ruminal). Se guardaron en botellas de plástico en el congelador, en la oscuridad, hasta que fueron analizadas.

3.7 Preparación de las Muestras.

Para el análisis se tomaron con una pipeta 5 ml de cada muestra y se transfirieron a un tubo de centrífuga. A continuación se añadió un ml de una solución 3:1 de ácido metafosfórico al 25% y ácido fórmico. El ácido metafosfórico se emplea con el objeto de precipitar las proteínas que contaminan la columna. Después de 30 minutos se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por quince minutos. El sobrepodante se encuentra listo para inyección directa a la columna.

3.8 Determinación de los Ácidos Grasos por Cromatografía de Gases.

Se preparó una mezcla standard de composición aproximada al líquido ruminal, conteniendo los ácidos acético, propiónico y butírico en medio acuoso. Por cada cinco muestras de líquido ruminal se empleó un standard acidificado y centrifugado de la misma manera. La concentración de los --

ácidos grasos volátiles individuales se calculó comparando las áreas de los picos obtenidos, con las áreas obtenidas - con la solución standard, y teniendo en cuenta la dilución. Las áreas se calcularon manualmente, por el método de triangulación .

3.9 Condiciones Experimentales.

Se empleó una columna de acero inoxidable de seis - piés de largo y un octavo de pulgada de diámetro. El soporte fue Chromosorb W, DMCS, malla 60/80 y la fase estacionaria consistió en 20 % de Tween 80 y 2 % de ácido fosfórico.

El aparato empleado fue marca Varian, modelo 940, - con registrador A-3. Se mantuvieron las siguientes condiciones:

| | |
|---------------------------|---------------------|
| Temperatura del inyector | 200°C |
| Temperatura de la columna | 110°C |
| Temperatura del detector | 200°C |
| Flujo de nitrógeno | 30 ml/min |
| Flujo de aire | 300 ml/min |
| Flujo de hidrógeno | 20 ml/min |
| Velocidad del registrador | 1 cm/min |
| Sensibilidad | 10^{-10} amp/volt |

Tamaño de la muestra se varió de 2 μ l a 6 μ l según la concentración.

Se empleó una jeringa Hamilton con adaptador Chaney para hacer el volumen de inyección más preciso.

3.10 Determinación de Alcohol.

El alcohol fue determinado por cromatografía de gases, empleando la misma preparación de la muestra y con las mismas condiciones experimentales, excepto que la temperatura de la columna se mantuvo a 70°C y el inyector y el detector a 100°C.

Las concentraciones de alcohol se obtuvieron por comparación contra un Standard de alcohol etílico al 1 % en agua.

3.11 Nitrógeno Total, Soluble, Insoluble, Volátil y Uréico.

A) Nitrógeno Total.

Una alícuota de 10 ml del líquido fermentado se analizó por el método de Kjeldahl para determinar su contenido de nitrógeno.

b) Nitrógeno Soluble.

Se centrifugó una alícuota de 20 ml a 2000 rmp -- por diez minutos y diez ml del sobrenadante se emplearon para determinar nitrógeno por el método de Kjeldahl.

c) Nitrógeno Insoluble.

La diferencia entre el nitrógeno soluble y el nitrógeno total se tomó como nitrógeno insoluble.

$$N_i = N_t - N_s.$$

d) Nitrógeno Volátil.

Este se obtuvo destilando quince ml de muestra -- preparada con quince ml de sosa al 10% y cien ml de agua. El destilado se recibió sobre ácido clorhídrico 0.1 N y se empleó como indicador anaranja do de metilo para titular el exceso de ácido con sosa 0.1 N.

e) Nitrógeno Uréico.

A tres ml de muestra inactiva se añadieron dos ml de ureasa al 1% en agua. Se colocó la mezcla en un

baño a 37°C durante diez minutos, con agitación - constante.

A continuación se inyectó a la solución tres ml de sosa al 10% y se enfrió en un baño de hielo. Los pasos subsiguientes se realizaron de igual manera que en la determinación de nitrógeno volátil, Simultáneamente con la muestra se procesó un control sin ureasa. La diferencia entre este control y el problema se tomó como nitrógeno uréico.

3.12 Reductores Totales.

Se centrifugaron treinta ml de muestra a 2000 rpm durante diez minutos. Se tomó veinte ml del sobrenadante y se le adicionó cinco ml de ácido clorhídrico 6 N, dejándose reposar veinticuatro horas.- A continuación se neutralizó con sosa al 20%, se aforó a cien ml y se empleó como reactivo titulante en el método descrito por Monson y Walker - - (AOAC).

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES E INTERPRETACION.

4.1 Fermentación Espontánea de Melaza con Microorganismos ruminales. (Sin controles).

Esta fermentación fue realizada con un inóculo inicial de trecientos ml. de líquido ruminal. El sustrato fueron cien ml. de melaza 55°Brix y con 2% de urea, agregándose además cien ml de saliva artificial. Se hicieron recambios de la misma cantidad de saliva y melaza cada veinticuatro horas.

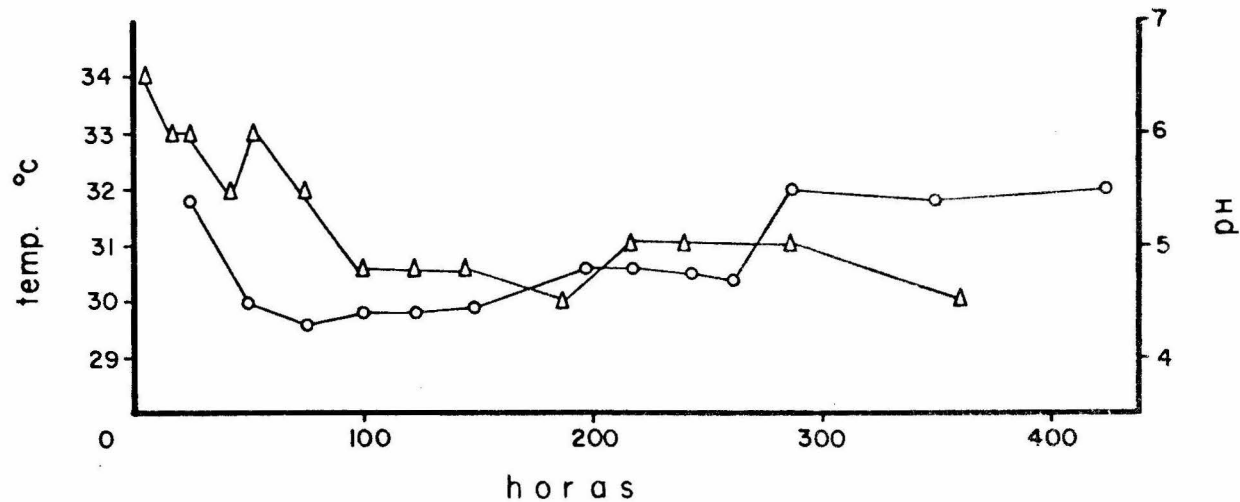
En la figura 5 se observan las variaciones de pH y temperatura registradas. A las ciento cincuenta horas se agregó a la saliva bicarbonato de sodio, que inicialmente no contenía, causando éste un pequeño aumento tanto en el pH como en la temperatura. A las doscientas cincuenta horas se modificó el pH con sosa al 30 % para mantenerlo como se aprecia en la figura. En la figura 8 se observa que existe una correlación entre el nitrógeno uréico y el nitrógeno metabolizado soluble.

En la figura 6 se grafican las variaciones de los ácidos grasos volátiles, los cuales tienden a desaparecer con el tiempo. Esta tendencia se ve influenciada por el pH,

al igual que la producción de alcohol, figura 7.

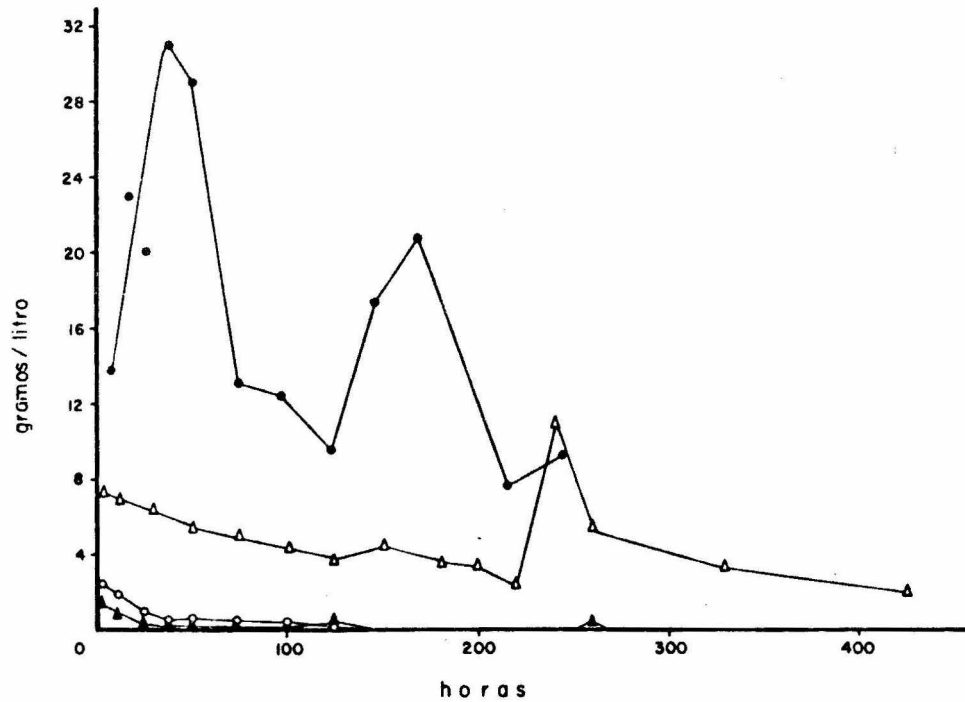
La cantidad de reductores residuales nos indica que la fermentación depende principalmente del alcohol, pues se observa que son inversamente proporcionales.

FIG. 5 VARIACIONES DE TEMP. Y PH DURANTE LA FERMENTACION ESPONTANEA DE MIEL-UREA CON MICROGANISMOS RUMINALES.



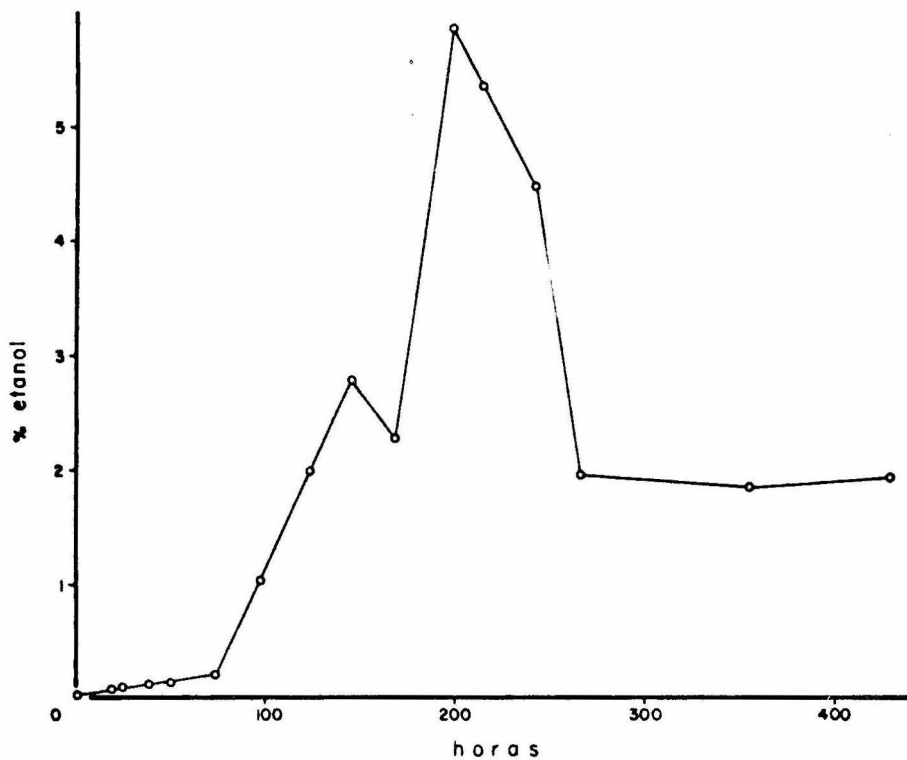
LAS MEDICIONES QUE SE REPORTAN SON LAS LEIDAS EN CADA RECAMBIO DE MIEL.

FIG. 6 PATRON DE FERMENTACION PRODUCIDO POR LOS MICROGANISMOS RUMINALES EN ALIMENTACION CONTINUA CON MIEL 55° BRIX UREA AL 2% Y SALIVA ARTIFICIAL SIN CONTROLES DE PH Y TEMPERATURA



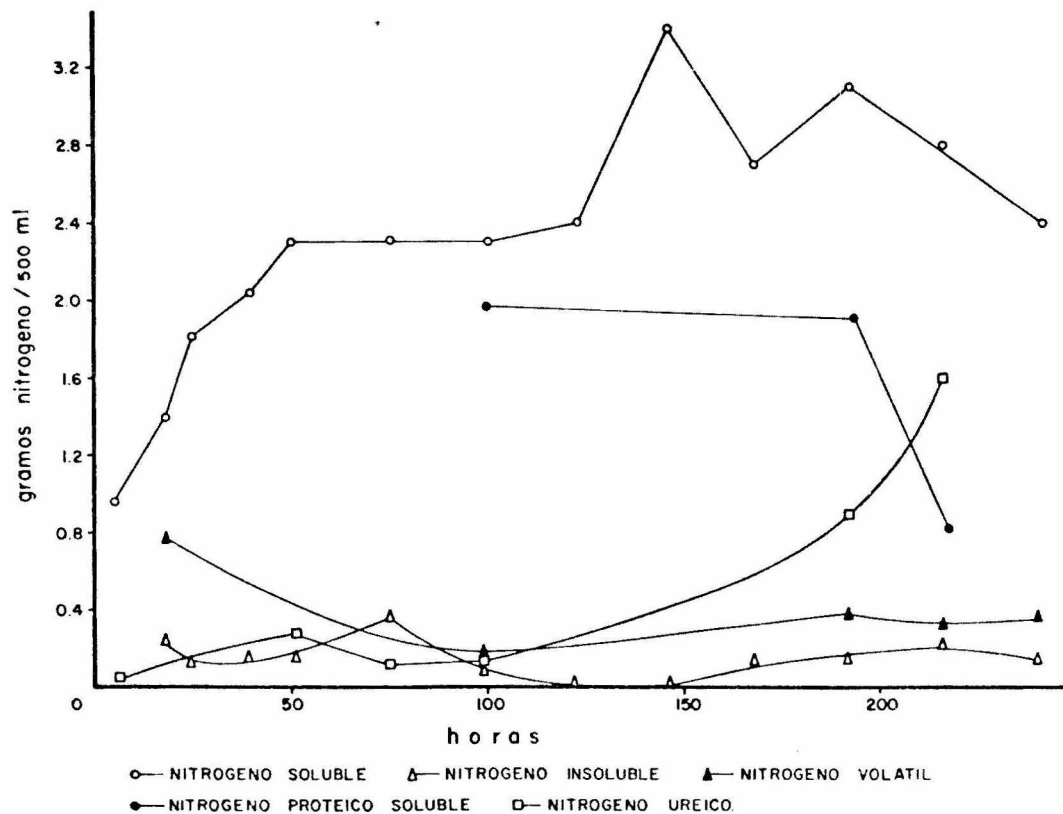
●—REDUCTORES TOTALES DETERMINADOS ▲—ACIDO ACETICO ○—ACIDO PROPIONICO
 ▼—ACIDO BUTIRICO. LAS DETERMINACIONES SE REALIZARON EN CADA RECAMBIO.

FIG. 7 PRODUCCION DE ALCOHOL DURANTE LA FERMENTACION DE MIEL-UREA Y SALIVA CON INOCULO INICIAL DE LIQ. RUMINAL SIN CONTROL DE PH Y TEMPERATURA.



LAS DETERMINACIONES DE ALCOHOL FUERON POR CROMATOGRAFIA DE GASES EN CADA RECAMBIO DE MIEL.

FIG. 8 DISTRIBUCION DEL NITROGENO DURANTE LA FERMENTACION CONTINUA DE MIEL-UREA POR MICROORGANISMOS RUMINALES SIN CONTROL DE pH Y TEMPERATURA.



4.2 Fermentación de Melaza por Microorganismos Ruminales a pH Controlado.

Debido a que la fermentación espontánea en condiciones rudimentarias produjo metabolitos indeseables, se realizaron las siguientes modificaciones:

El líquido ruminal se incubó durante las seis primeras horas a 40°C, y se le colocó un aislante al fermentador. El pH se mantuvo entre 5.5 y 6.5, empleando para esto sosa al 30 %, con el objeto de variar el volumen lo menos posible. Figura 9.

En este experimento se observó que la producción de alcohol fue menor del 1 % (Figura 11). Se utilizó menos urea y por consiguiente el nitrógeno soluble disminuyó. (Figura 12).

Por lo que respecta a los ácidos grasos volátiles, (figura 10), se observó un aumento en el ácido butírico, disminución del ácido propiónico y el ácido acético se mantuvo en proporción normal. Esta anomalía fue reportada por Preston (50), en animales intoxicados con miel de caña, y Marty (38), reportó experimentos en los que mantiene una proporción alta de ácido butírico in vitro con animales adaptados a melaza in vivo.

FIG. 9 VARIACIONES DE TEMP. Y pH DURANTE LA FERMENTACION A pH CONTROLADO DE MIEL-UREA CON MICROGANISMOS RUMINALES.



LAS MEDICIONES QUE SE REPORTAN SON LAS LEIDAS EN CADA RECAMBIO DE MIEL.

† — ○
pH — ●

FIG. 10 PATRON DE FERMENTACION PRODUCIDO POR MICROGANISMOS RUMINALES ALIMENTADOS CONTINUAMENTE CON MIEL 55° BRIX UREA AL 2% Y SALIVA ARTIFICIAL A pH CONTROLADO.

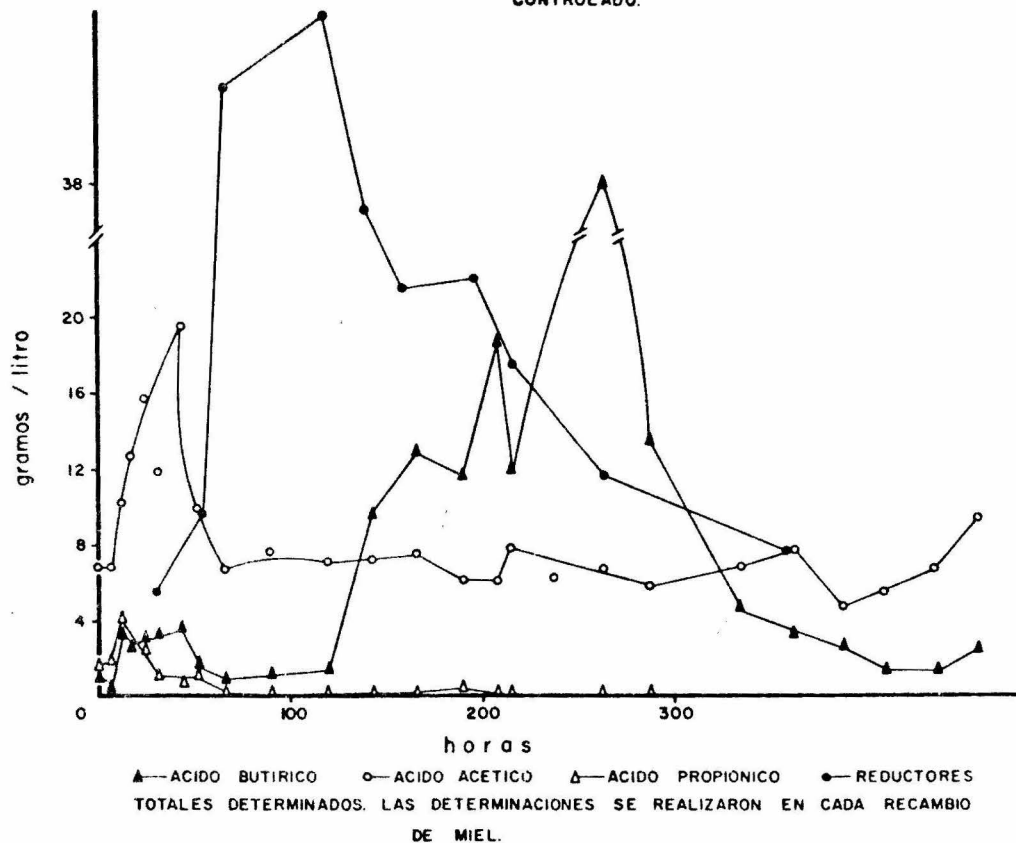
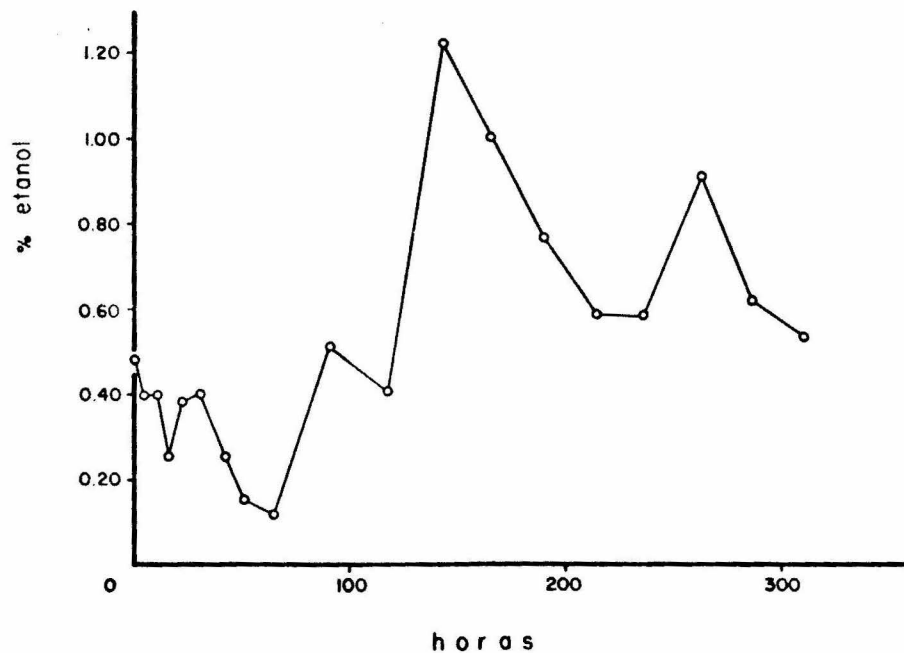
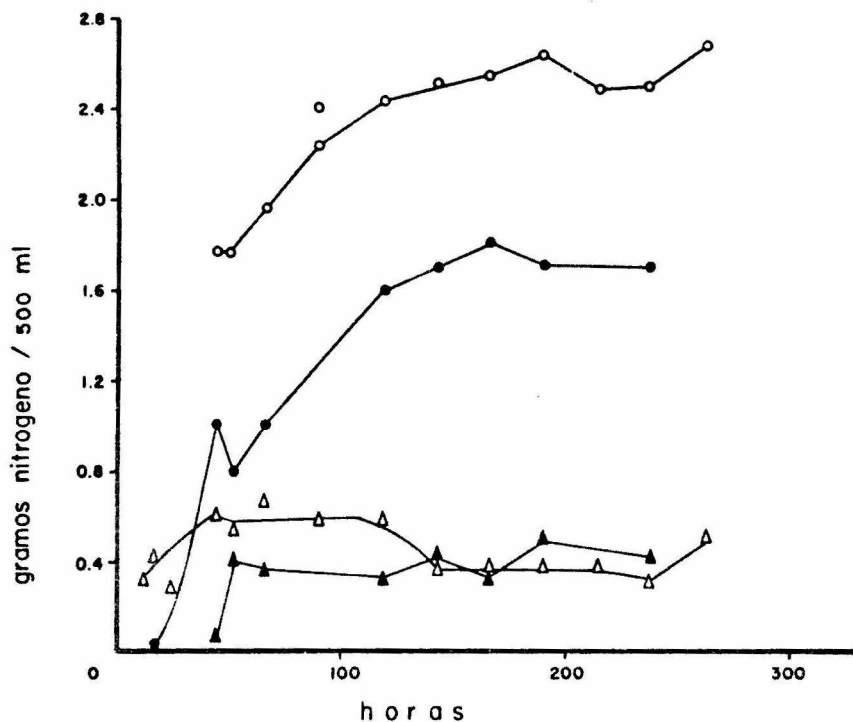


FIG. II PRODUCCION DE ALCOHOL DURANTE LA FERMENTACION A PH CONTROLADO DE MIEL-UREA Y SALIVA ARTIFICIAL CON INOCULO DE LIQ. RUMINAL.



LAS DETERMINACIONES SE REALIZARON POR CROMATOGRAFIA DE GASES EN CADA RECAMBIO DE MIEL.

FIG. 12 DISTRIBUCION DEL NITROGENO DURANTE LA FERMENTACION CONTINUA DE MIEL-UREA POR LOS MICROORGANISMOS RUMINALES A PH CONTROLADO.



○—NS (NITROGENO SOLUBLE, EQUIVALENTE A NITROGENO QUE NO SEDIMENTA A 2000 R.P.M. DURANTE 10 MIN.). ●—NU (NITROGENO UREICO). ▲—NPS (NITROGENO PROTEICO SOLUBLE DETERMINADO POR LA DIFERENCIA ENTRE [(NU+NV)-(NS)] DETERMINADO COMO AMONIACO PRODUCIDO AL REACCIONAR UNA MUESTRA DEL "RUMEN IN VITRO" CON 2 ml UREASA AL 1% 10 MIN. A 37° C. △—NV (NITROGENO VOLATIL [NH₃⁺]).

4.3 Fermentación de Diversas Fracciones de Contenido Rumi- nal con Diferentes Sustratos.

Para caracterizar las diversas fracciones del contenido ruminal, se realizaron incubaciones a corto plazo (períodos de 8 horas) en matraces cerrados, con agitación constante y a una temperatura de 39°C.

El contenido ruminal se dividió en: fibra larga, fibra corta y sobrenadante. También se empleó en el experimento una muestra con contenido ruminal completo.

La fibra larga se obtuvo al exprimir el contenido ruminal; la fibra corta fue la porción que sedimentó en el líquido ruminal filtrado con una gasa; el sobrenadante fue la porción sobrante al eliminar la fibra corta.

Se emplearon tres clases de sustrato: miel de caña - 55°Brix, sacarosa y azúcar invertido. Los tres contenían la misma proporción de carbohidratos y un 2 % de urea.

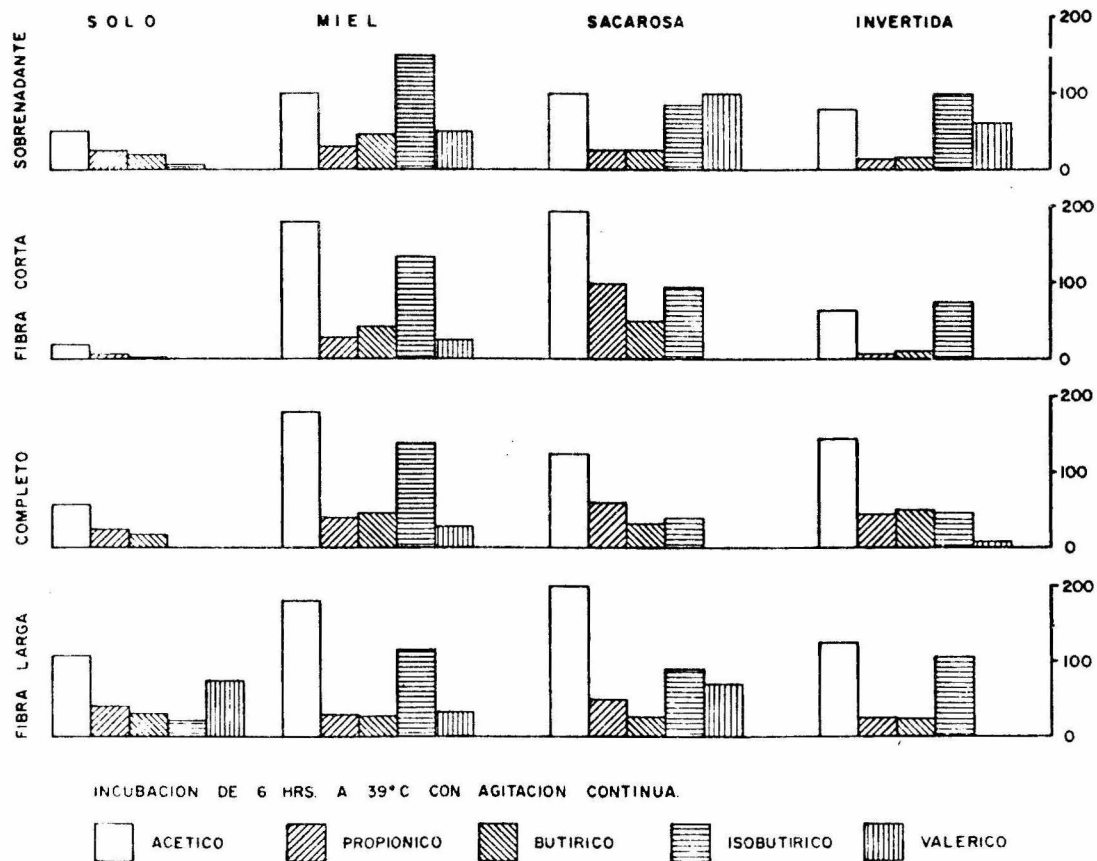
En el esquema siguiente se aprecian los resultados obtenidos. La sacarosa fue el único sustrato que mantuvo -- una producción normal con respecto a la relación propióni--

co-butírico en las incubaciones con fracciones de fibra corta, fibra larga y contenido ruminal completo.

El azúcar invertido demostró que en estas condicio--nes es mal sustrato y que su fermentación dependió de los -microorganismos presentes en las diversas fracciones de contenido ruminal, ya que en el sobrenadante y en la fibra corta prácticamente no hubo producción de ácido butírico, ni -de ácido propiónico. En la fibra larga si aumentó un poco -la producción, y en el contenido ruminal completo se produjeron ambos metabolitos en proporción más significativa.

La melaza produjo un patrón anormal (con el ácido --propiónico en menor proporción que el butírico) en el contenido ruminal completo, sobrenadante y fibra corta. En la fibra larga no produjo ni butírico ni propiónico.

PRODUCCION RELATIVA DE ACIDOS GRASOS VOLATILES POR DIFERENTES COMPONENTES DEL LIQUIDO RUMINAL.



4.4 Fermentación Continua de miel, Urea y Aminoácidos por Microorganismos ruminales.

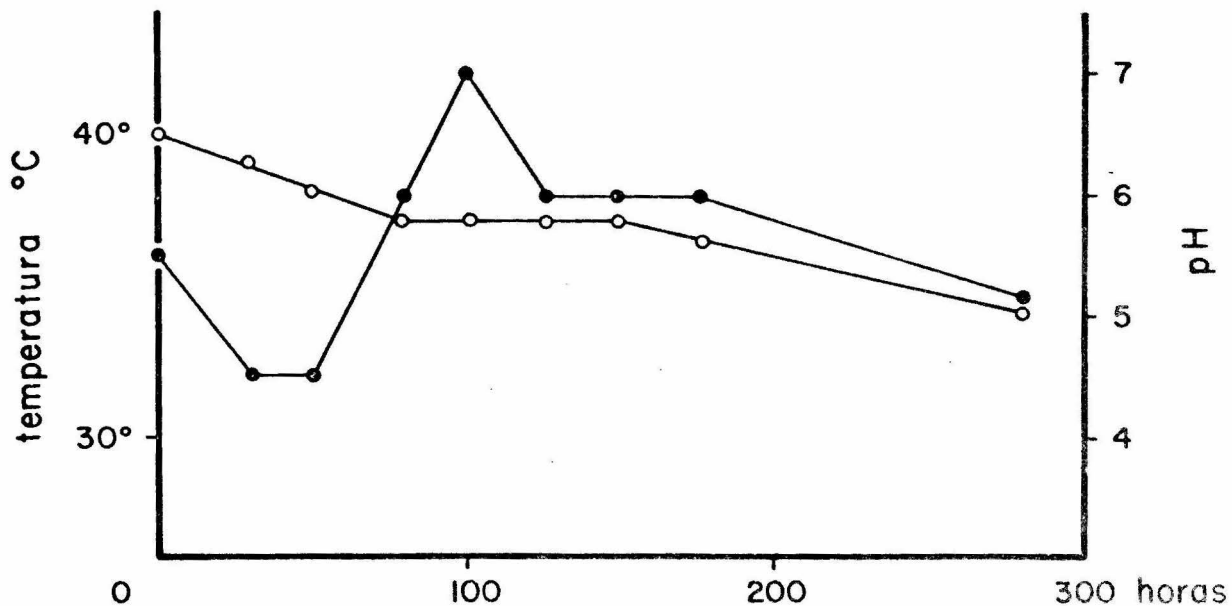
Este experimento se llevó a cabo con el objeto de ver como se altera el patrón de fermentación ruminal de miel-urea por la presencia de aminoácidos.

Se empleó un inóculo inicial de cuatrocientos ml de líquido ruminal y como sustrato cien ml de melaza 52°Brix, al 5 % de urea y 1.5 g de casaminoácidos, agregando cien ml de saliva artificial. Se hicieron recambios de la misma cantidad de saliva, melaza y aminoácidos cada veinticuatro horas.

En la figura 13 se observa que la temperatura se mantuvo entre 36 y 40°C y el pH entre 4.5 y 7.

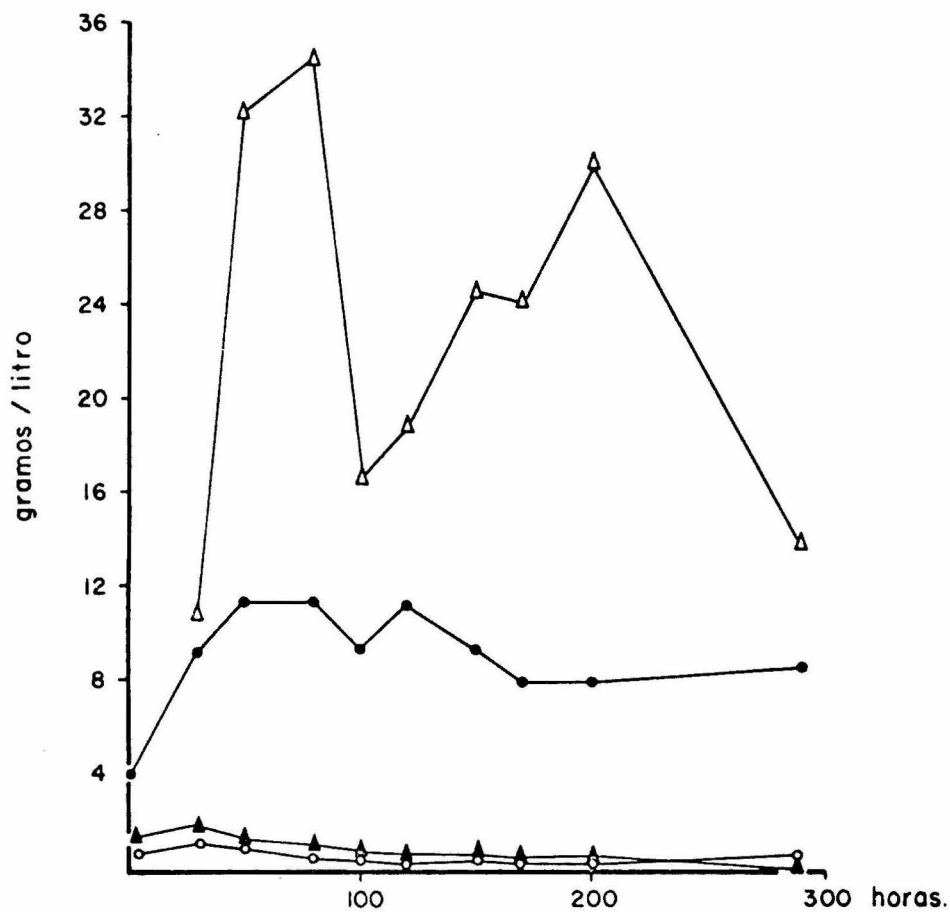
En la figura 14 se pueden apreciar las variaciones de los ácidos grasos volátiles y es importante hacer notar que guardaron las proporciones consideradas como "normales" durante todo el experimento, es decir: siempre hubo mayor proporción de ácido acético y el ácido propiónico se mantuvo siempre en mayor proporción del butírico.

FIG. 13 VARIACIONES DE TEMPERATURA Y pH DURANTE LA FERMENTACION CONTINUA DE MIEL-UREA-AMINOACIDOS POR MICROORGANISMOS RUMINALES.



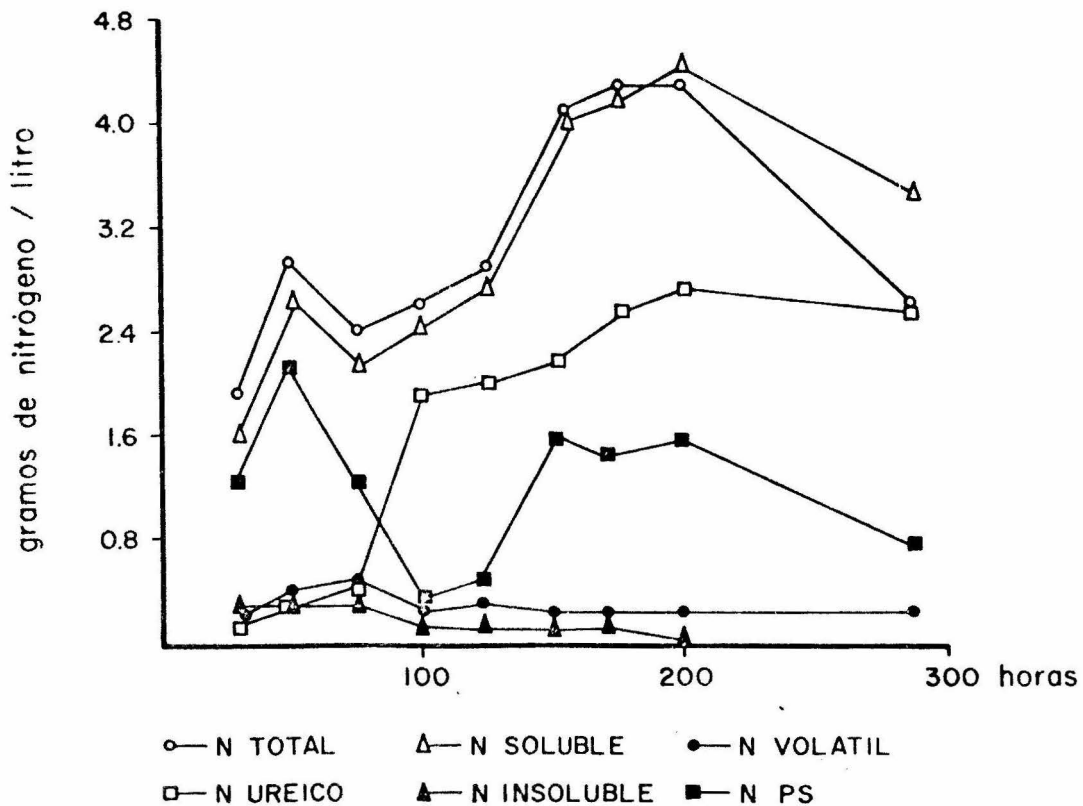
LAS MEDICIONES QUE SE REPORTAN SON LAS LEIDAS EN CADA RECAMBIO DE MIEL. ○ — † ● — pH.

FIG. 14 PATRON DE FERMENTACION PRODUCIDO DURANTE LA FERMENTACION CONTINUA DE MIEL-UREA-AMINOACIDOS POR LOS MICROORGANISMOS RUMINALES.



LAS DETERMINACIONES SE REALIZARON EN CADA RECAMBIO. ACIDO ACETICO—●,▲—ACIDO PROPIONICO
ACIDO BUTIRICO—○,△—REDUCTORES TOTALES.

FIG. 15 DISTRIBUCION DEL NITROGENO DURANTE LA FERMENTACION CONTINUA DE MIEL-UREA-AMINOACIDOS POR MICROORGANISMOS RUMINALES.



4.5 Resultado de la engorda de novillos con melaza.

En la siguiente tabla se reportan los resultados - del experimento. Se observa un promedio de ganancia diaria en peso que es muy inferior (un cincuenta por ciento menor) al reportado por Preston en 1972 en Cuba (50).

ANALISIS DE LA MATANZA DEL DIA 30 DE MARZO DE 1974

EN EL RASTRO DE XALOSTOC

| Nr. de animales | Peso inicial | Peso al sacrificio | Promedio de ganancia diaria en peso | Peso promedio de la canal |
|-----------------|---------------|--------------------|--|------------------------------|
| 87 | 255.36 | 311.86 | 0.441 | 163.82 |
| | <u>+22.26</u> | <u>+18.96</u> | | |

| Rendimiento % | Acidos | Grasos | Volátiles | (μ moles/litro) |
|---------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| | Acético | Propionico | Butirico | Totales % |
| 52.53 | 76.3 | 14.4 | 9.2 | 60.2 |
| | <u>+5.1</u> | <u>+2.5</u> | <u>+3.5</u> | <u>+29.8</u> |

Las muestras para determinación de Acidos Grasos Volátiles fueron tomadas de animales sin ayuno, Post mortem.

5. DISCUSION.

La mayoría de los estudios realizados sobre fermentación continua de microorganismos ruminales (Ruffener 1963, Mah 1964, Stewart 1961) han tenido como principal objetivo el reproducir las condiciones ruminales en el laboratorio. Con este fin se han diseñado fermentadores que cumplan con los controles más rigurosos y mantengan las condiciones lo más apegado posible al rumen in vivo.

Sin embargo, los experimentos que se realizaron en este trabajo, fueron más simples y menos rigurosos. Las condiciones de fermentación fueron semejantes a las de una fermentación alcohólica simple con una variante de importancia: se empleó un cultivo mixto de flora ruminal en vez de cultivos puros de levaduras. Se obtuvieron como resultado patrones diferentes, debido principalmente a la utilización de sustratos de fermentación comerciales y a las condiciones de operación poco controladas.

No obstante, a excepción de la fermentación espontánea de la miel, los productos principales de la fermentación fueron los mismos que se observan en los rumiantes.

En la fermentación espontánea de la miel se observó-

que, al mantenerse el pH del medio alrededor de 4.5, las levaduras desplazaron a los microorganismos ruminales, y con esto se produjo la fermentación alcohólica con una producción cercana a las concentraciones que alcanza industrialmente.

Este resultado señala que el pH es una variable importante del medio ambiente y que es necesario mantenerlo entre 6.0 y 6.5 para disminuir la producción de etanol y lograr un nivel elevado de ácidos grasos volátiles.

Con el control del pH y la temperatura, se obtuvieron como principales productos de la fermentación un patrón anormal de ácidos grasos y una concentración de alcohol menor del 1 %. El patrón de fermentación con la relación propiónico/butírico invertida, concuerda con los resultados de experimentos in vivo reportados por Marty y Preston (39), para animales alimentados con dietas ricas en miel de caña y urea. Por otra parte, es interesante recordar que en experimentos in vitro sobre digestibilidad de la celulosa por el líquido ruminal (58), la fermentación muestra tendencia a producir ácido butírico cuando el período de incubación es prolongado, desconociéndose hasta el momento la causa de esta anomalía.

Se han hecho experimentos para tratar de explicar este fenómeno. Una hipótesis fue que la deficiencia en forraje ocasionaba falta de movimientos ruminales. Para demostrarlo se alimentó animales con forraje plástico (5). Sin embargo, no se pudo controlar el aumento de ácido butírico y se llegó hasta una relación 1:4 de propiónico/butírico, en tanto que, con forraje verde, las proporciones se mantuvieron 1:1.

Los resultados anteriores parecían indicar que el forraje verdadero y algunos otros sólidos se retenían en el rumen más tiempo, originando así que se mantuviera más alta la concentración de propiónico. Los microorganismos que producen este metabolito tal vez estuvieran asociados de alguna manera con las fibras que tenían mayor tiempo de residencia en el rumen. No obstante, los resultados obtenidos en el experimento 4.3 no demuestran que el ácido propiónico predomine en el sustrato incubado con fibras; solo se pone en evidencia la existencia de diferentes clases de microorganismos en las diversas fracciones de contenido ruminal.

En la fermentación en presencia de aminoácidos, experimento 3.4, fue evidente el predominio de la flora productora del patrón de fermentación ruminal normal, ya que las-

proporciones de los ácidos grasos se mantuvieron correctas. Es obvia la importancia de la proteína verdadera para que - predomine la flora que produce los ácidos grasos volátiles- en las próporciones deseadas.

Hay que recordar que la melaza tiene un contenido -- muy bajo de proteína, y que las especies de microorganismos que crecen bien en ella producen muy poco o nada de ácido- propiónico y principalmente ácidos acético y butírico.(15)

Si bien es cierto que las bacterias ruminales sintetizan proteínas a partir de nitrógeno no protéico, estas proteínas no contienen varios de los aminoácidos esenciales -- (Chalupa, 1972), la presencia de los cuales solo puede lo-- grarse con proteína de buena calidad.

6. CONCLUSIONES.

La presencia de cantidades adecuadas de proteína verdadera en las dietas ricas en miel de caña es uno de los factores determinantes para obtener el patrón ruminal de ácidos grasos volátiles considerado "normal" y característico de animales de alta productividad. La carencia de proteína verdadera ocasiona que la flora del rumen produzca menos ácidos grasos volátiles y en proporciones diferentes a las observadas en animales sanos.

La inversión de la relación propiónico/butírico y consecuente disminución del ácido propiónico (precursor de glucosa a nivel celular), conduce al animal al estado denominado toxicidad de la melaza.

Por consiguiente, es de vital importancia para que la engorda con melaza se lleve a cabo con éxito, que los animales reciban un suplemento protéico de buena calidad, que contenga los aminoácidos esenciales para que la flora que predomine en el rumen sea la adecuada.

Las conclusiones de este trabajo contribuyen al esclarecimiento de la ecología ruminal en los siguientes aspectos:

- 1) Si bien ya se sabía que las proteínas eran importantes para el rumiante, en estos experimentos se pone en evidencia que también son importantes para los microorganismos del rumen, ya que la producción de los ácidos grasos se acerca más a los niveles considerados representativos de bovinos de alta productividad en presencia de aquellas.
- 2) Se estima de una manera diferente los requerimientos protéicos de los rumiantes, ya que debe incluirse el factor de proteína soluble de buena calidad, el cual hasta el momento no ha sido empleado por los organismos oficiales que publican tablas para el balance de dietas comerciales.
- 3) Se propone que la proteína soluble juega un papel de suma importancia en el mantenimiento del sistema ecológico y dinámico del rumen, lo cual difiere de la teoría que propone a las proteínas insolubles como las de mayor eficiencia para los rumiantes.

Lista de Tablas.

- Tabla I.- Rendimientos por hectárea en toneladas métricas de las cosechas productoras de carbohidrato en países tropicales. (22)
- Tabla II.- Productos y subproductos de la caña. (22)
- TABLA III.- Composición de la melaza proveniente de diversos países. (22)
- TABLA IV.- Comparación de un lote de 10,000 cabezas de ganado cubano de engorda con dieta basada en melaza (1970-71) y basada en forraje (1969). (42)
- Tabla V.- Composición molar de los ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal de ganado alimentado con niveles altos de melaza, comparados con valores de la literatura para dietas convencionales. (39)
- Tabla VI.- Fermentación ruminal con dietas basadas en grano, forraje, o melaza. (15)
- Tabla VII.- Efectos en la fermentación ruminal al sustituir maíz por melaza en una dieta baja en forraje para vacas lecheras. (55).

Bibliografía.

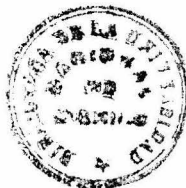
1. Ackman R.G. y Burgher R.D.; ANALYTICAL CHEMISTRY; 35: 647 ,(1963).
2. Annison E.F. ; BIOCHEM. JOURNAL; 66 : 592 (1957).
3. Annison E.F. y Lewis D. ; EL METABOLISMO EN EL RUMEN; Editorial Hispanoamericana. Primera Edición, 1966.
4. A.O.A.C. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS; Assoc. of - -- Official Agr. Chemists. Washington D.C., 1969.
5. Benavides M.C. y Preston T.R. ; REV. CUBANA AGRIC.; - 5 : 319 (1971)
6. Bergman E.N. ; BIOCHEM. JOURNAL ; 97 : 53 (1965).
7. Bergman E.N.; AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY.; 211 : 793 (1966).
8. Burroughs W.; J. ANIMAL SCIENCE; 9 : 513 (1950).
9. Carlstrom G. ACTA VET. SCAND.; 6 : 52 (1965).
10. Carrol E.J. y Hungate R.E.; APPL. MICROBIOLOGY; 2 : - (1954).

11. Cottyn B.; REV. AGRIC. BRUSSELS; 9 973 (1965).
12. Cottyn B.C. y Boucque C.; J. AGRIC. AND FOOD CHEM.; -
16 : 106 (1968).
13. Decker P.; DEUT. TIERARTZL. WOCHSCHR. ; 69 : 509 - --
(1962)
14. Dukes H.H.; THE PHYSIOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS; Cor--
nell University Press, 1955.
15. Elias A.; Ph.D. THESIS; University of Aberdeen (1971)
16. Elsdon S.R.; THE ENZYMES; Vol. II. Academic Press - -
Inc (1952).
17. Elsdon S.R.; BIOCHEM. JOURNAL ; 40 : 252 (1946).
18. Emery E.M. y Koerner W.E.; ANALYTICAL CHEMISTRY ; 33
146 (1961).
19. Erwin E.S., Marco G.J., Emery A.M.; J. DAIRY SCIENCE;
44 : 1768. (1961).
20. Fenner H. y Elliot J.M. ; J. ANIMAL SCIENCE ; 22 : --
624 (1963).

21. Gehrke C.W. y Lamkin W.M.; J. AGRIC. AND FOOD CHEM.;-
9 : 85 (1960).
22. Gohl B.I.; TROPICAL FEEDS; FAO. Geneva, 1972.
23. González E.; TESIS PROFESIONAL. Esc. Nal. de Medicina-
Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1965.
24. Hungate R.E.; THE RUMEN AND ITS MICROBES; London Aca-
demic Press Inc., 1966.
25. James A.T. y Martin J.P.; BIOCHEM. JOURNAL; 50 : 679
(1952).
26. James A.T. y Martin H.P. ; BIOCH. JOURNAL ; 50 : 679-
(1952).
26. James A.T. y Martin J.P.; BIOCHEM. JOURNAL; 63 : 1 44
(1956).
27. Johns A.T.; AGRICULTURAL REVIEW : 35 A : 262 (1951).
28. Kleiber M.J. ; BIOLOGICAL CHEM.; 197 : 371 (1952).
29. Krebs H.A.; CHEMICAL PATHWAYS OF METABOLISM; Academic
Press Inc. N.Y., 1954.

30. Ladd J.N.; BIOCHEM. JOURNAL : 67 : 4 (1957).
31. Lewis F.; FISILOGIA DIGESTIVA Y NUTRICIONAL DE LOS -
RUMIANTES. Editorial Limusa Wiley, 1966.
32. Lofgreen G.P.; J. ANIMAL SCIENCE ; 24 : 480 (1965)
33. Lofgreen G.P. y Otagaki K.J.; J. ANIMAL SCIENCE ; 19 :
392 (1971).
35. Losada H. y Preston T.R.; REV. CUBANA DE CIENCIA Y --
AGRIC.; 6 : 1. 1972.
36. Mah R.A. y Hungate R.E.; J. PROTOZOOL. ; 12 : 131 - -
(1964)
37. Marston H.R.; BIOCHEM. JOURNAL; 42 : 564 (1948).
38. Marty R.J. y Demeyer D.I.; BRITISH JOURNAL OF NUTRIT.
30 : 369 (1973).
39. Marty R.J. y Preston T.R.; REV. CUBANA DE CIENCIA Y -
AGRIC. ; 4 : 183 (1970).
40. Merino H.Z. y Raun N.S. : J. ANIMAL SCIENCE ; 24 : --
397 (1965).

41. Mills R.C., Lardinois C.C., Rupel I.W. y Hart E.B.; -
J. DAIRY SCIENCE ; 27 : 571 (1944).
42. Muñqz F., Morciego S., Martin J.L. y Willis M.B.; REV.
CUBANA DE CIENCIA Y AGRIC. ; 4 : 163 (1970).
43. Natrajan S.; J. DAIRY SCIENCE; 55 : 238 (1971).
44. Pearson R.M. ySmith J.; BIOCHEM. JOURNAL ; 37 : 153 -
(1943).
45. Pennington R.J.; BIOCHEM. JOURNAL ; 56 : 410 (1954).
46. Pennington R.J. y Sutherland T.M.; BIOCHEM. JOURNAL;-
63 : 618 (1956).
47. Pennington R.J.; BIOCHEM. JOURNAL; 51 251 (1952).
48. Preston T.R. y Willis M.B. ; OUTLOOK AGRIC.; 6 : 2 --
(1969)
49. Preston T.R. y Martin J.L. : REV. CUBANA DE CIENCIA Y
AGRIC.; 6 : 1 (1972).
50. Preston T.R.; WORLD REVIEW OF NUTRIT. AND DIETETICS;-
17 : 1 (1972).



51. Preston T.R. y Hagelberg B.; NEW SCIENTIST; 5 oct. -- pag. 31 (1967).
52. Preston T.R.; Elías A., Willis, M.B. y Sutherland T.M. NATURE; 19 : 727 (1967).
53. Preston T.R., Willis M.B. y Elías A.; NATURE ; 216 :- 721 (1967).
54. Rufener W.H., Nelson W.O., Wolin M.J.; APPL. MICROBIOLOGY; 11 : 196 (1963).
55. Smith G.S.; J. NUTRITION; 71 : 20 (1960).
56. Steel R., Torrie J.H.; PRINCIPLES AND PROCEDURES OF STATISTICS; Mc. Graw Hill Co. Inc. 1960.
57. Stewart D.F., Warner R.G. y Seeley H.W.; APPL. MICROBIOLOGY; 9 : 150 (1961).
58. Tisserand J.L. y Zelter S.Z.; ANN. BIOL. ANIM. BIOCHEM.; AND BIOPHYSICS ; 5 : 101 (1965).
59. Vargas V.E. y Raun N.S.; TECNICA PECUARIA EN MEXICO; - 3 : 40 (1964).
60. Ward A.H.; NAT. ASSOC. CORN AND AGRIC. MERCHANTS; Lon don, 1960.