

01673



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

7
24

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Modificación a la Técnica Fibra Detergente Neutro de Van Soest (1991), Sustituyendo a la Alfa Amilasa A-3306 [®] por la Alfa-Amilasa del *Bacillus licheniformis* (Takatherm [®]) en Análisis de Alimentos Ricos en Almidón.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL:
NUTRICION Y ALIMENTACION**

P R E S E N T A :
Lucas ^{Gelacio} Melgarejo Velázquez

Asesores: Ph.D. Germán Mendoza Martínez
M. C. Fernando Plata Pérez
M. C. Humberto M. Troncoso Altamirano

MEXICO, D.F.

1995.



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 está 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.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario



Lucas G. Melgarejo Velázquez

Dedicatoria.

A mis viejos que aun me hacen favor de vivir.

A mis hijos que forman parte de esta juventud entusiasta y que promete.

A Reynaldo mi hermano que deseo se restablezca porque ahora se debate entre la vida y la muerte por la irresponsabilidad de los cafes de siempre.

A Mario☪ mi hijo y Ricardo☪ mi amigo que se fueron antes de tiempo pero que están aún con su entusiasmo y juventud.

Agradecimientos.

Al Laboratorio de Bromatología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco por su ayuda desinteresada al proporcionar equipo, material y orientación técnica para efectuar el trabajo.

Al personal del laboratorio de Bromatología del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados por su orientación técnica y haber proporcionado las enzimas empleadas.

Al personal técnico del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. por haber proporcionado orientación y material para la realización del trabajo.

A la micro sección de computo del Depto. de Nutrición y Bromatología de la F.M.V.Z. por permitirme el uso del equipo y programas para la captura, estadística (SAS) e impresión del trabajo.

Al personal técnico del laboratorio Clínico de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. por la determinación desinteresada de la concentración enzimática del Takatherm y proporcionar el reactivo lugol empleado en el trabajo.

MELGAREJO VELAZQUEZ LUCAS G. Modificación a la técnica fibra detergente neutro de Van Soest (1991), sustituyendo a la alfa amilasa A-3306® por la alfa-amilasa del *Bacillus licheniformis* (Takatherm®) en análisis de alimentos ricos en almidón. (bajo la asesoría de Mendoza M.,G.D.¹; Plata P.,P². ; Troncoso A., H.³)

RESUMEN.

El trabajo se realizó en la ciudad de México. El objetivo fue sustituir la alfa amilasa del A-3306® de la técnica de Fibra Detergente Neutro (FDN) de Van Soest (1991) por la del *Bacillus licheniformis* (Takatherm) en dietas altas en almidón. A la segunda se le hicieron pruebas con diferentes niveles de ésta y de almidón puro de maíz, granos de sorgo y maíz molidos, a tiempos de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. a pH 7 y temp. de 90 a 93 C, con agua destilada y/o el método de Van Soest modificado a cbp 100 ml o su equivalente. En ambas enzimas se usaron 200 ppm de iones de calcio (cloruro de calcio). Se descartaron con pruebas de lugol los niveles que a simple vista presentaban color azul por presencia de almidón. Los niveles de enzima sin coloración azul que estuvieron por arriba de 0.075 ml en niveles de almidón inferiores a 1.5 g, se les hicieron pruebas de fotocolorimetría para detectar residuos integro de almidón, pruebas de Fehling modificada (Elanoy Lennon) para azúcares reductores y se les determinó desaparición de almidón en el papel filtro. Aquellos niveles de enzima con mejores resultados se compararon con la amilasa A-3306 empleándose granos de maíz y sorgo molido (malla No. 40) y almidón. Con modificaciones al método FDN que fueron: a) Una predigestión a las fuente de almidón de 30 min. con el Takatherm y A-3306 más la digestión convencional con FDN y b) Digestión de esas fuentes con ambas enzimas y fibra detergente neutro a pH 7, agregando el EDTA a los 55 minutos de iniciada la ebullición, sin predigestión. Se encontró que los mejores niveles amilolíticos de Takatherm estuvieron entre 0.1 a 0.5 ml y del almidón inferiores a 1 g. La comparación de enzimas con la prueba a) se encontraron los siguientes resultados de digestibilidad 87.4, 86.8, y 96 % para el Takatherm y 84.6, 87.3 y 98.3 para A-3306 respectivamente y no habiendo diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de las dos enzimas, pero se encontraron por efecto del sustrato, habiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el almidón con sorgo y maíz. Para la prueba b) 91.4, 91.5 y 98.8% para Takatherm y 88.5, 88.9 y 98.3% para A-3306 respectivamente para sorgo, maíz y almidón. Tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de enzima pero las hubo ($p < 0.05$) del almidón con el sorgo y el maíz. El análisis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de técnica usada, siendo la digestibilidad de 90.2 % para la de predigestión y de 92.82 % para el de FDN modificada. Se concluyó que se puede sustituir la A-3306 por Takatherm L-340 con la técnica modificada de FDN, habiendo con ello una considerable reducción de los costos .

¹ Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

² Universidad Autónoma Metropolitana-X, México.

³ Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

Modification to Van Soest's 1991 neutral detergent fiber determination, substituting the A-3306[®] alfa-amylase for the *Bacillus licheniformis* Takatherm[®] alfa amilase in the analysis of starch-rich feedstuffs

Melgarejo V.L.¹, Mendoza M.G.D.², Plata P.F.³ y Troncoso A.H.¹

ABSTRACT: The objective of this experiment was to substitute the alpha-amylase (A-3306[®]) by the amylase from *Bacillus licheniformis* (Takatherm L-340[®]) in the neutral detergent fiber methodology in the Van Soest's method for determining neutral detergent fiber (NDF) in starch-rich feedstuffs, in order to reduce the cost of these analyses and to have a readily-available alternative to the original enzyme. In order to find the amount of TK that best degraded starch, three different substrates (ground grain sorghum, ground corn and starch) were treated with the test enzyme in a completely randomized design with three repetitions and two subsamples per repetition. The greatest degradation of starch was obtained using between 0.1 and 0.5 ml of TK, when starch levels were less than 1 g (P<0.01). The TK enzyme was then compared to the A-3306[®] enzyme in two modified techniques: predigestion and modified FDN. There were not significant differences (p>0.05) between enzymes, with average values of digestibility, 90.07% for TK and 90.98% for A-3306. There were significant differences (p<0.05) between starch (97.97%) with sorghum (87.97%) and corn (88.63%). Also were significant differences (p<0.05) by the effect of technique with 90.24% for predigestion and 92.82% for modified FDN technique.

Key words: neutral detergent fiber, alpha-amylase, *Bacillus licheniformis*.

Palabras clave: fibra detergente neutro, alfa-amilasas, *Bacillus licheniformis*.

¹Depto. Nutrición Animal y Bioquímica, F.M.V.Z, U.N.A.M., México.

²Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

³Universidad Autónoma Metropolitana-X, México.

CONTENIDO .

Página

Introducción	1
Justificación :.....	3
Objetivo	3
Hipótesis	3
Revisión de literatura	4
Componentes del contenido celular	4
Almidón	4
Aamilasas	8
Alfa Amilasa	9
Beta Amilasa	9
Glucoamilasa	11
Alfa Amilasa del <i>Bacillus licheniformis</i>	13
Componentes de la pared celular	15
Celulosa	15
Hemicelulosa	17
Lignina.....	17
Métodos de análisis.....	19
Química proximal	19
Fibra detergente neutro de Van Soest.....	21
Características generales de Takatherm L-340	29
Material y Métodos	32

Primera etapa experimental	33
Segunda etapa experimental	34
Tercer etapa experimental	35
Cuarta etapa experimental	36
Preparación de Fibra Detergente Neutro	36
Prueba de Fehling	31
Diseño estadístico	37
Resultados	39
Primera etapa experimental	39
Segunda etapa experimental	43
Tercer etapa experimental	47
Cuarta etapa experimental	49
Discusión	57
Primera etapa experimental	57
Segunda etapa experimental	57
Tercer etapa experimental	59
Cuarta etapa experimental	60
Conclusiones	62
Literatura citada	63
Apéndice de Cuadros	68
Apéndice de Resultados	85

Índice de cuadros y figuras.

Página

Cuadro 1. División de la materia orgánica del forraje por el sistema de análisis con detergentes	5
Cuadro 2. Apariencia microscópica de algunos gránulos de almidón	10
Cuadro 3. Contenido de amilosa y amilopectina en varios almidones	12
Cuadro 4. Biodisponibilidad de los componentes del forraje	18
Cuadro 5. Porcentaje de lignina, pentosas y celulosa del alimento que son disueltos en la fibra cruda	23
Cuadro 6. Esquema general del análisis de forrajes usando detergentes	25
Cuadro 7. Modificaciones al método de fibra detergente neutro	27
Cuadro 8. Desaparición del almidón (1 g) con Takatherm (0.25 ml) a pH neutro y ácido en agua a 30 minutos	40
Cuadro 9. Efecto de dos niveles de Takatherm L-340® sobre la desaparición en tres niveles de almidón a 15 minutos de ebullición en agua	41
Cuadro 10. Desaparición de diferentes niveles de almidón con dos de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua	42
Cuadro 11. Desaparición de 1 gramo de almidón por efecto de diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua	43
Cuadro 12. Desaparición de 1 gramo de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 y 30 minutos de ebullición con agua	44
Cuadro 13. Desaparición de 1 g de almidón a 3 niveles de Takatherm L-340® y a 4 tiempos de ebullición en agua	45
Cuadro 14. Desaparición de diferentes niveles de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 30 minutos de ebullición en agua.....	46
Cuadro 15. Desaparición de 1 g de almidón en solución de Fibra Detergente Neutro con predigestión con 0.25 ml de Takatherm L-340® a diferentes tiempos de ebullición en agua	47

Cuadro 9A. Análisis Estadístico. Efecto de dos niveles de Takatherm L-340® sobre la desaparición en tres niveles de almidón a 15 minutos de ebullición en agua	69
Cuadro 10A. Análisis Estadístico. Desaparición de diferentes niveles de almidón con dos de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua	70
Cuadro 11A. Análisis Estadístico. Desaparición de 1 gramo de almidón por efecto de diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua	71
Cuadro 12A. Análisis Estadístico. Desaparición de 1 gramo de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 y 30 minutos de ebullición con agua	72
Cuadro 13 A. Análisis estadístico. Desaparición de 1 g de almidón a 3 niveles de Takatherm L-340® y a 4 tiempos de ebullición en agua	73
Cuadro 14A. Análisis Estadístico. Desaparición de diferentes niveles de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 30 minutos de ebullición en agua	74
Cuadro 15A. Análisis Estadístico. Desaparición de 1 g de almidón en solución de Fibra Detergente Neutro con predigestión con 0.25ml de Takatherm L-340® a diferentes tiempos de ebullición en agua	75
Cuadro 16A. Análisis Estadístico. Desaparición del grano de sorgo (1 g) con Solución Fibra Detergente Neutro modificado y con predigestión en agua a 30 minutos mas solución Fibra Detergente Neutro agregando el polvo o preparando la solución, usando 0.25 ml de TK .	76
Cuadro 17A. Análisis estadístico. Efecto de Takatherm (0.25 ml) sobre sorgo molido (1 g) con solución Detergente Neutro modificada 55 minutos y con predigestión en H₂O por 30 minutos	77
Cuadro 18A. Análisis estadístico. Desaparición de los granos de sorgo, maíz y almidón por efecto de Takatherm L-340® y A-3306® en la técnica modificada de FDN de Van Soest	78

	Página
Cuadro 19A. Análisis estadístico. Desaparición de los granos de sorgo, maíz y del almidón por efecto de la FDN y previa digestión con agua y con Takatherm L-340® y A-3306® por 30 minutos en ebullición	79
Cuadro 20A. Análisis estadístico. Promedios de desaparición en tres sustratos por efecto de las enzimas Takatherm L-340® A-3306® mediante las técnicas con Predigestión y Solución Detergente Neutro Modificada	80
Cuadro 21A. Análisis estadístico. Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de sustratos digeridos por la Solución de Detergente Neutro Modificado y enzimas Takatherm L-340® y A-3306®	81
Cuadro 22A. Análisis estadístico. Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling del filtrado de sustratos digeridos por solución Detergente Neutro y Predigestión con Takatherm L-340® y A-3306®	82
Cuadro 23A. Análisis estadístico. Promedios de azúcares reductores (g) y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de sustratos digeridos por solución FDN modificado y con predigestión con Takatherm y A-3306 (0.25 ml)	83
Cuadro 24A. Análisis estadístico. Lectura (nm) por fotocolorimetría y contenido de almidón (%) en el líquido sobrenadante de los tratamientos con almidón predigerido por Takatherm L-340® y A-3306® más solución Detergente Neutro	84
Figura 1. Apariencia microscópica de varios tipos de almidones	7
Figura 2. Vía del ácido síquico para la formación de compuestos aromáticos	16

Modificación a la técnica fibra detergente neutro de Van Soest (1991), sustituyendo a la alfa amilasa A-3306® por la alfa-amilasa del *Bacillus licheniformis* (Takatherm®) en análisis de alimentos ricos en almidón.

INTRODUCCIÓN

En muchos estudios sobre nutrición y alimentación animal es esencial determinar el contenido exacto de paredes celulares en el alimento. Los carbohidratos estructurales presentes en la pared celular, se cuantifican eficientemente en forrajes por medio de análisis con detergente neutro o ácido propuesto por Van Soest, y cuando se emplea esta técnica en alimentos ricos en almidón, se debe utilizar amilasa para impedir la interferencia causada por este polisacárido. La amilasa SIGMA A-3306 recomendada en la técnica (1991) tiene la desventaja de poca disponibilidad en el país y elevado costo. Para evitar la inexactitud en el análisis se han propuesto diversas modificaciones (54), y en este trabajo se pretende emplear la alfa-amilasa termoestable Takatherm L-340 como sustituto de aquella.

Las tendencias actuales de alimentación en los animales domésticos intentan maximizar su producción (7, 12, 16, 18, 35, 53). Los alimentos son evaluados en función de la productividad del animal, lo anterior está relacionado con su composición y contenido de energía y proteína (4, 6, 44).

Los carbohidratos insolubles y la lignina de los alimentos se agrupan en lo que en el análisis químico proximal y en nutrición se conoce como fibra (15, 56). Los métodos desarrollados para su cuantificación se basan principalmente en detergentes o enzimas (15, 49). La fibra esta compuesta por polisacáridos estructurales (celulosa), polisacáridos no estructurales (hemicelulosa, pectina) y polifenoles complejos (lignina) presentes en tejidos vegetales, y su cuantificación esta limitada a productos de ese origen. El análisis de estos compuestos presenta problemas debido a la complejidad de sus mezclas y a la diversidad de las estructuras de los polímeros que lo componen. Las técnicas desarrolladas se pueden dividir en las que fraccionan cuantificando cada componente por separado, y las que lo hacen en conjunto (15, 49, 50). En estas últimas, la metodología se utiliza con fines rutinarios y

económicos y, cuando es necesario, se realiza el fraccionamiento e identificación de cada polímero por separado (15)

El trabajo de Van Soest y sus colaboradores (15, 52, 53) en el desarrollo del uso de detergentes en análisis de fibra, ha proveído al campo analítico de grandes avances y dado origen a métodos utilizados que miden el material total de la pared celular y la fibra (celulosa + lignina). Estas técnicas, también empíricas, proveen mejores métodos para medir la fibra de los alimentos, especialmente forrajes (50).

Parte del almidón es insoluble en el detergente neutro, elevando el valor si no se remueve enzimáticamente. La protefna también produce problemas técnicos al formar espumas durante la extracción y etapa final de la filtración. Las grasas pueden dificultar la filtración y alteran los resultados finales de la fibra (42, 50). Los métodos, básicamente químicos de hidrólisis del almidón con ácido sulfúrico usados en la industria desde el siglo pasado, se han modificado al disponerse de preparaciones enzimáticas más eficaces, hasta llegar al proceso actual totalmente enzimático (24).

La alfa-amilasa cataliza la hidrólisis de enlaces α 1,4 con una actividad tipo endo. La alfa-amilasa bacteriana inicialmente producida por *Bacillus subtilis* actúa a una temperatura óptima entre 60 y 70 C requiere de la presencia de iones de calcio. Con el fin de hidrolizar el almidón es necesario llevar un proceso térmico anterior a la reacción enzimática (24)

Desde 1973 se han comercializado enzimas α -amilasas de elevada termoestabilidad producida por *Bacillus licheniformis*; cuyas temperatura óptima es de 80 a 110 C, elimina el tratamiento térmico previo y combina la acción de la temperatura con la hidrólisis enzimática (24).

Las determinaciones para cuantificar fibra de los alimentos, no son absolutas. Muchos factores modifican los resultados (10, 42), siendo necesario estandarizar rigurosamente los métodos analíticos en centros e instituciones que efectúan investigación (18, 32, 33).

Justificación:

La justificación del trabajo es la carencia en México de otra alternativa enzimática con igual o más eficiencia y economía que la enzima Sigma A-3306® en el análisis de alimentos para rumiantes con la técnica de Fibra Detergente Neutro propuesta por Van Soest en 1991 en dietas con forrajes que son ricas en almidón.

OBJETIVOS

- a) Desarrollar una metodología que permita solubilizar a los almidones que enmascaran los resultados de la Fibra Detergente Neutro propuesta por Van Soest en 1991 en dietas compuestas por forrajes con niveles elevados de fuentes de almidones como el sorgo y maíz, sustituyendo a la α -amilasa A-3306® por la α -amilasa producida por el *Bacillus licheniformis* (Takatherm L-340®).
- b) Comparar la acción amilolítica de la enzima A-3306 con las del *Bacillus licheniformis* (Takatherm L-340®) en el análisis de Fibra Detergente Neutro en sustratos ricos en almidón (sorgo y maíz).
- c) Validar dos técnicas modificadas (predigestión y solución Fibra Detergente Neutro modificado) en almidón, granos de sorgo y maíz para ser usadas en la determinación de fibra detergente neutro.

HIPÓTESIS

Ho: El uso de la alfa-amilasa del *Bacillus licheniformis* (Takatherm L-340®) no solubiliza el total del almidón en dietas para rumiantes mediante la determinación de fibra detergente neutro (Van Soest 1991), produciendo una sobre estimación de la fibra.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los carbohidratos incluyen a los azúcares, almidón, celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y sustancias afines (2, 3, 16, 21, 27). De su configuración estructural de aldosa o cetosa, sólo la glucosa y la fructosa se presentan en forma libre en la naturaleza (27, 56).

Los carbohidratos son digeridos por exoenzimas hasta oligosacáridos que son disponibles a la microbiota ruminal (18, 30). Basados en datos *in vitro* e *in vivo* se observa que en rumiantes la digestión de carbohidratos son importantes como fuentes de energía para el crecimiento bacteriano; el nivel de digestión está relacionado con la concentración de almidones, celulosa, hemicelulosa y pectinas (10, 19, 29, 42, 43). La disponibilidad de nutrimentos para las bacterias ruminales y enzimas digestivas del animal es base de las estimaciones nutricias que se hacen en el laboratorio (29, 35, 47, 53).

Célula vegetal.

La célula vegetal está compuesta por el contenido celular cubierto por una pared celular (23, 53). Los carbohidratos, proteínas, y lípidos del contenido celular son los más digestibles en el tracto digestivo de rumiantes (38, 43) y no rumiantes (7, 26, 27). En la pared celular se localizan glúcidos complejos, proteínas y minerales asociados con lignina; como se observa en el Cuadro 1. el potencial de digestión de los carbohidratos celulósicos más bajo que el del contenido celular (26, 51).

Contenido celular.

Almidón: es un polímero de condensación de la glucosa. En forma cuantitativa, las hexosas proveen la mayor cantidad de energía para las necesidades de los animales que cualquier otro carbohidrato. El material de reserva de la mayoría de las plantas esta formado por almidón y se encuentra en forma granular en semillas, raíces, tubérculos, rizomas y en pequeñas cantidades en las partes de la planta como retoños (30, 56).

CUADRO 1.

División de la materia orgánica del forraje por el sistema de análisis con detergentes.

Fracción	Componentes	Disponibilidad
Contenido Celular (Soluble en Detergente Neutro)	Lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, materia insoluble en agua, Pectina, almidón, N.N.P., Proteína soluble	Completamente digestible, excepto lignina.
Constituyentes de la Pared Celular (Fibra insoluble en Detergente Neutro)		
1) Soluble en Detergente Ácido.	Hemicelulosa, Proteína ligada a fibra	Parcialmente digestible de acuerdo al grado de lignificación
2) Fibra Detergente Ácido.	Celulosa, Lignina, N-lignificado	

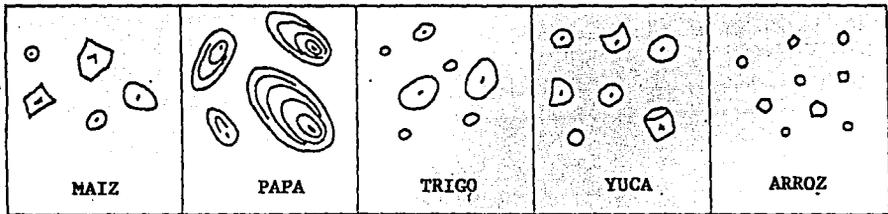
Van Soest, 1967.

Los gránulos son depositados en las semillas, tubérculos, vainas y tallos tiernos de plantas como reserva alimenticia para el período de dormancia, germinación y crecimiento. Al microscopio se muestra un compuesto de gránulos que van de 2 a 100 micras de diámetro. El tamaño y forma de los gránulos son peculiares en cada variedad de almidón (46); como se observa en el Cuadro 2 y en el Esquema 1.

Las dextrinas son un grupo mal definido de productos intermedios de la hidrólisis, digestión y acción del calor sobre el almidón. Son de bajo peso molecular y muy ramificados (3, 27). En los animales derivan de la remoción de la amilopectina, dejando residuos ramificados llamados α -dextrinas límite compuestos por 8 a 10 unidades de glucosa. Las dextrinas también aparecen como productos intermedios cuando el almidón se convierte en glucosa en semillas que están germinando para generar la energía que requieren las plantulas.

El tratamiento del almidón con calor seco produce su hidrólisis y despolimerización, rearreglo de la configuración y repolimerización (27). La unidad básica del almidón comprende la unión de moléculas sucesivas de D-glucosa por medio de enlaces α 1, 4 glicosídicos (27, 30), si esa estructura se compara con la de la celulosa y otros polisacáridos estructurales, en estos las unidades de monosacáridos están unidos por enlaces beta, mientras que en almidones y glucógeno son enlaces α (53, 54). Hay dos clases de almidón: a) Las amilosas, de cadenas largas no ramificadas que solo tienen enlaces α 1,4 de D- glucosa y constituyen del 25 al 30% del almidón total como se muestra en el. Debido a la configuración *cis* del carbono número 6 de la amilosa, ésta tiende a existir en forma helicoidal.

Con ésta forma puede retener una gran cantidad de yodo en su parte entral tomando coloración azul cuando reacciona con este elemento. La amilopectina retiene menos yodo porque su conformación helicoidal esta restringida por las ramificaciones y a ellas se debe que toma color rojo (3).; b) Las amilopectinas, insolubles en agua caliente y peso molecular superior a un millón (27), polisacáridos en cadenas ramificadas de 19 a 26 unidades de



Swinkels J. J. (1985).

Esquema 1.

Apariencia microscópica de varios tipos de almidones

glucosa que posee enlaces α 1,4 en los puntos de ramificación y enlaces α 1, 4 en otros sitios varían ámpliamente sus pesos moleculares y no son raros los de varios millones.

El fósforo es un componente normal de la amilopectina, existiendo alrededor de una parte por cada 400 unidades de glucosa (30).

Amilasas usadas en la hidrólisis del almidón. Las enzimas que hidrolizan los almidones son conocidas como amilasas. La α amilasa (E.C. 3.2.1.1., α (1,4)-glucanohidrolasa), conocida desde hace años por su producción de oligosacáridos al romper enlaces α del almidón. En una clásica hidrolasa con un modo de acción que permiten oligosacáridos de 35 a 100 al romper enlaces α del almidón siendo más activa sobre cadenas largas, que sobre cortas. Se encuentra en la naturaleza producida por gran número de animales, plantas y microorganismos (29, 41) y sus propiedades fisicoquímicas varían de acuerdo a la fuente que las produce. Las α amilasas se han estudiado extensivamente, pero solo las de algunas especies de *Bacillus* han sido explotados comercialmente (41).

Las α amilasas pancreáticas y salival hidrolizan enlaces α (1, 4) en polímeros de glucosa que contengan al menos tres residuos. Su actividad comienza por los extremos reductores de un molécula de almidón y escinden enlaces α (1,4) hasta llegar a un punto de ramificación con enlaces α (1, 6) (41). Esta enzima es una endo-hidrolasa, que rompe enlaces internos de la molécula de almidón, produciendo dextrinas de diversos pesos moleculares, maltosa y algunas moléculas de glucosa (24). También se conocen las β -amilasas las que liberan unidades maltosa. Estas son unas exo-hidrolasas que requieren un extremo no reductor para comenzar su acción y cuando menos tres unidades de glucosa unidas con enlaces α (1,4). En general hidroliza las moléculas de almidón produciendo maltosa como producto principal, sobre todo cuando el sustrato es únicamente amilosa. Sobre amilopectina, los productos de la reacción son maltosa y una dextrina conocida como β -límite, debido a que ya no puede ser hidrolizada por esa enzima, al no tener libres tres unidades de glucosa unidas en forma lineal (24).

Las β -amilasas pueden atacar malto-oligosacáridos. También la amilopectina y el glucógeno, liberando fracciones de 3 o 4 unidades de glucosa (41). Jarabes altos en maltosa pueden producirse con enzimas que rompan enlaces α (1,6) y también sobre α (1,4) como con pululinasa e isoamilasa. Mezclas de pululinasa y β amilasa pueden producir maltosa de amilopectina, glucógeno y cantidades altas de dextrinas límites (14).

La capacidad de degradabilidad enzimática sobre el almidón por α amilasas dependen de la variación en los tipos de almidón como serían el tamaño del gránulo, porcentajes de amilopectina y procesamiento al que han sido sometidos, por ejemplo la degradabilidad del almidón puro de maíz es diferente a la del harina del mismo (5, 25). Mendoza y *et al* (1991) encontraron que el grano de maíz tiene mayor digestibilidad que el de sorgo y el almidón de papa por acción de amilasas de microorganismos ruminales; éste efecto fue atribuido a una cantidad mayor de azúcares libres en el maíz (29). También el pH y la concentración de enzima influyen sobre la degradabilidad enzimática, así Franco y (1987) encontró que usando α -amilasa diamiloglucosidasa había un efecto hidrolítico diferente al variar concentraciones de enzima y pH (13). Los tipos de almidones en los cereales varían por genotipo y fenotipo (21). Debido a la cantidad de uniones hidrógeno en su superficie, algunos gránulos son resistentes a la ruptura. El almidón de los tubérculos como en las papas, que debe ser cocida para aprovecharse como alimento en el cerdo y las aves. El cocimiento con calor húmedo produce la ruptura de los gránulos de almidón y un cambio irreversible en la estructura cristalina de la molécula (gelatinización), de este modo facilita el ataque enzimático (56).

Los almidones, una vez gelatinizados por calentamiento en soluciones acuosas, pueden ser hidrolizados enzimáticamente con amilasas, sus mecanismos de acción son muy diferentes, de tal manera que al analizar los productos de las reacciones enzimáticas se puede identificar y cuantificar al polisacárido en cuestión (11).

CUADRO 2.

Apariencia microscópica de algunos gránulos de almidón.

Almidón	Tipo	Tamaño (diámetro) y rango (μ)	Tamaño (diámetro) promedio	Forma
Maíz	Cereal	3-26	15	circular, poligonal,
Papa	Tubérculo	5-100	33	oval, específica
Trigo	Cereal	2-35	15	circular, lenticular
Yuca	Raíz	4-35	20	oval, truncada
Papa dulce	Raíz	5-25	15	poligonal

Swinkels J. J. M. (1995)

α -amilasa. El poder reductor de las soluciones de almidón aumenta relativamente poco durante la acción de ésta enzima, en tanto que la viscosidad de las soluciones amiláceas decae rápidamente. En particular, cuando actúa sobre amilosa, el componente lineal del almidón puede producir maltotriosa, maltosa y glucosa como productos finales de la reacción a tiempos prolongados. Sobre amilopectina produce algo de maltotriosa, muy poca maltosa y glucosa y una serie de oligosacaridos ramificados conocidos como dextrinas. (24).

β -amilasa. El poder reductor de las soluciones amiláceas se incrementa rápidamente al actuar esta enzima en tanto que la viscosidad decae lentamente. Las dextrinas β -límite obtenidas de amilopectina, pueden ser hidrolizadas por α -amilasa y las dextrinas producidas en esta reacción pueden ser hidrolizadas nuevamente por β -amilasa. De esta manera la acción conjunta de las dos enzimas da como productos finales maltosa, isomaltosa y un poco de glucosa (24).

Glucoamilasa. Esta enzima también es una exohidrolasa que actúa en el extremo no reductor de las moléculas de almidón, pero a diferencia de la β -amilasa, solo requiere de la unión de dos moléculas de glucosa. eventualmente el producto final de la reacción de esta enzima es glucosa únicamente, actuando en amilosa tanto como en amilopectina. La pérdida de viscosidad de las soluciones de almidón es más lenta que cuando actúa β -amilasa y el aumento en el poder reductor es mas rápido (24).

Seis enzimas se han usado en la hidrólisis de almidón: α amilasa bacteriana, glucoamilasa (amiloglucosidasa), pululanasa, isoamilasa, beta-amilasa y fungo-amilasa. todas difieren en su modo de acción, rompiendo enlaces de moléculas de almidón. De estas enzimas; la α amilasa bacteriana y la glucoamilasa son las de mayor importancia para la hidrólisis de almidón. La primera hidroliza inicialmente enlaces interiores en amilosa y

CUADRO 3.**Contenido de amilosa y almidopectina en varios almidones.**

Almidón	Amilosa %	Amilopectina %
Maíz	28	72
Papa	21	79
Trigo	28	72
Yuca	17	83
Maíz seroso	0	100
Sorgo	28	72
Arroz	17	83
Amilo- maíz	50-80	20-50

Swinkels J. J. M. (199

amilopeptina o mezcla de oligosacáridos que contienen todos los enlaces alfa (1-4) y alfa (1-6), el primero mejor que el segundo, sugiriendo que la combinación de las dos enzimas producirían glucosa pura. Las α y β amilasas fungales producen solo maltosa a partir de oligosacáridos, usándose en la producción de maltosa a partir de oligosacáridos, para la producción de jarabes con alto contenido de maltosa. Las seis amilasas pueden ser usadas, pero comercialmente se emplean la α -amilasa y glucoamilasa (41).

Las α -amilasas se han estudiado extensivamente, pero solo las de algunas especies de *Bacillus* han sido explotados comercialmente (41).

Múltiples estudios se han realizado sobre otras alfa amilasas de *Bacillus* termofílicos y termoestables como *Bacillus stearothermophilis*, *B.coagulans*, *B. caldolyticus*, *B. acidocaldarius*, *B. circulans* y *B. licheniformis* (41).

Hasta la década pasada, la α amilasa del *B. amyloliquefaciens* fue empleada principalmente en la producción enzimática de dextrinas, para la subsecuente conversión de jarabes altos en glucosa. Amplias investigaciones para reemplazarla con enzimas más estables al calor y que produzcan altas concentraciones finales adoptándose últimamente la α amilasa del *Bacillus licheniformis* en muchos procesos (41).

α -amilasa del *B. licheniformis*.

La más estable de todas las α amilasas es la del *B. licheniformis*. en general al mecanismo de acción es similar al de la α amilasa del *B. amilolichifaciens*, pero con diferencias en que en este produce 65 productos iniciales largos y posteriormente producen 65, 63, 62, 61 y 64 en orden descendiente. Los 63 y 62 no son atacados en su totalidad, habiéndose desacuerdos sobre los 69 y 65 que son formados de 66 (41).

Como la mayoría de las α amilasas, pero su mayor estabilidad requiere de iones de calcio y su adición incrementa la actividad enzimática. La adición de ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) remueve el calcio de la enzima aproximadamente dos iones de calcio por mol de enzima son suficientes para su actividad y mucho menos para mantener su estabilidad. Necesita un pH entre 5.5 a 6.5 y actúa fundamentalmente sobre enlaces α (1, 4) glucosídicos en oligosacáridos y polisacáridos para producir únicamente oligosacáridos de configuración α , tienen alta solubilidad sobre almidón, un poco baja sobre amilosa, amilopectina y glucógeno y decrece rápidamente al agotarse las cadenas. Esta enzima rompe enlaces α (1,4) de las moléculas de sustratos y reduce valores del color azul con la reacción de yodo y la viscosidad decrece rápidamente por el rompimiento de enlaces específicos, comparados con exoamilasas como son las glucoamilasa y beta amilasas. La α amilosa del *B. licheniformis* es de alto peso molecular cercano a 50 000-60 000 (41).

Operación comercial con α amilasas del *Bacillus*.

Para la α amilasa del *B. amiloliquefaciens* se recomienda condiciones de pH 6.5 a 90 C, siguiendo un cocimiento a presión a 140 C, seguida por dextrinización a 85 C con más enzima. Con la amilosa del *B. licheniformis*, dos pasos son suficientes: primero cocinar a pH 6.5 y 105 C durante 5 minutos con la enzima y después un largo cocimiento a pH 6.5 y 95 C (41).

El tratamiento a 85 o 95 C por un período largo de tiempo produce jarabes con niveles altos de glucosa, pero tratamientos mas largos a pH neutro ocasionan formación de compuestos como maltulosa α (1-4)-glucopiranosil-o-fructosa que son mas resistentes al ataque de glucoamilosa (41). Cuando se hidroliza por ácido o enzimas, el almidón es cambiado en dextrinas, maltosas y por último en glucosa (35).

Se han hecho estudios de diferentes amilasas por su acción amilolítica en sustratos del mismo origen y bajo las mismas condiciones no encontrándose diferencias significativas en ellas (22).

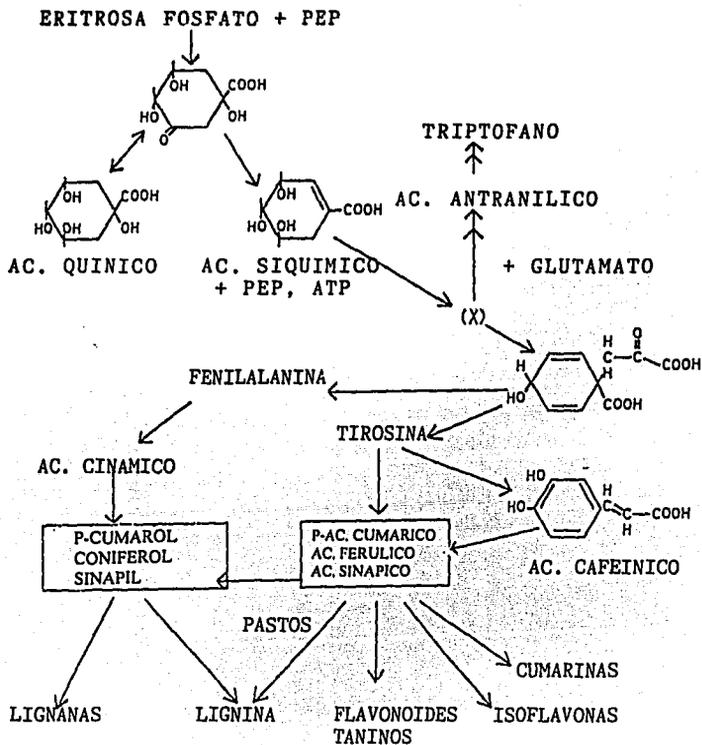
Componentes de la pared celular.

La pared celular del vegetal esta compuesto de una parte fibrosa (-celulosa-), una matriz (-lignina- y -hemicelulosa-), y relleno (-agua, taninos y otros compuestos orgánicos) (45, 53).

La celulosa es el polímero estructural mas abundante en las plantas y también la sustancia orgánica sobre la tierra (53). Se encuentra casi exclusivamente en las plantas. Por hidrólisis total produce únicamente D-glucosa. En hidrólisis parcial el disacárido celobiosa: β -D-glucopiranosil- (1-4) β -D-glucopiranososa. La hidrólisis de celulosa completamente metilada produce solamente 2, 3,6-tri-o-metilglucosa que indican ausencia de ramificaciones en la molécula de celulosa. (23, 27, 31).

La capacidad de los animales para utilizar la celulosa, hemicelulosa y pectina, dependen de la capacidad gastrointestinal del organismo para degradar estos y la habilidad de los herbívoros para hospedar y utilizar microorganismo y utilizar sus productos (9, 48, 53).

Los átomos de carbono de la D-glucosa de la celulosa están en posición *trans*, que le confiere estructura plana y fibrilar, sus unidades de glucosa tiene configuración de silla unidas por eslabones del tipo β , con gran estabilidad interna y las microfibrillas sujetas firmemente por uniones hidrogeno. Esta configuración hace que la celulosa sea insoluble en agua y resistente a la degradación enzimática (53). Hidrolizada a glucosa por ácidos fuertes; puede estar combinada o no con lignina, Ninguna de las enzimas de los mamíferos la desdobla pudiendo serlo por hongos y bacterias (9, 27). Si se le agrega un grupo hidroximetil al carbono 6 se forma un compuesto más soluble e hidrolizable (carboximetil-celulosa). Existen diferentes formas de celulosa, dependiendo de la especie vegetal. El número de moléculas de glucosas polimerizados pueden variar de 900 a 2000 (44).



Swinkels J. J. (1985).

Figura 2.

Vía del ácido síquico para la formación de compuestos aromáticos. Esta vía es una ruta para la síntesis de fenoles.

La hemicelulosa está constituida por: 1) Pentosanas, principalmente xilanas como cadenas de xilosa β -1,4 enlazadas de arabinosa, ácidos urónicos y ácidos metil urónicos. 2) Hexosanas, principalmente glucomanas y galacto glucomanas representadas por glucosa y manosa con enlaces β -1,4 o cadenas de glucosa con enlaces β -1,3 y β -1,4 (β -glucanas). Otros tipos de xilanas son las xiloglucanas con cadenas de xilosa y enlaces β -1,4 unidas a cadenas de glucosa con enlaces β (2, 3). Constituye del 10 al 30 % de la materia seca de los forrajes, encontrándose en mayor proporción en gramíneas que en leguminosas. Se degrada en el rumen por acción de hemicelulasas y glucano hidrolasas que incluyen a las L-arabinasas, D-galactonasas, D-mananasas y D-xilanasas, (2).

Las sustancias pécticas son polisacáridos estructurales de la lámina media y de la pared primaria en la célula vegetal, presentes en mayor cantidad en leguminosas que en gramíneas. Están compuestas por cadenas de ácidos D-galacturónicos con enlaces α -1,4 parcialmente esterificados con etanol y con interpolaciones de ramnosa. Constituyen del 10 al 20% en gramíneas y leguminosas y su digestibilidad *in vivo* varía entre el 70 y 90% (2, 9, 19, 35, 36). Los valores de biodisponibilidad de los componentes de los forrajes se indican en el Cuadro 4.

Lignina: La biosíntesis de compuestos aromáticos en las plantas donde pueden ocurrir en tres formas: Compuestos fenilpropanoides a través de la vía del ácido siquímico, compuestos terpenoides derivados de la polimerización del isopreno (3-metilbutano) y aquellos formados por condensación de grupos acetato. El mas importante de éstos grupos es el del fenilpropano que contiene los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano de donde derivan una gran variedad de compuestos no nitrogenados que incluyen flavonas de bajo peso molecular, taninos, lignanas, ligninas e isoflavonas, (53) como se muestra en la Figura 2.

CUADRO 4.

Biodisponibilidad de los componentes de los forrajes.

Componentes	Digestibilidad	Factor Limitante
Clase 1		
Carbohidratos Solubles	100	Consumo
Almidón		
Ac. Orgánicos	90	Perdida en heces
Proteínas	100	Consumo y/o toxicidad
Pectina	90	Fermentación (AGV y otros)
	98	Fermentación (AGV y otros)
Clase 2		
Celulosa		
Hemicelulosa	Variable	De acuerdo al grado de lignificación.
	Variable	
Clase 3		
Lignina		
Cutina	Indigestible	Se encuentran solo en la pared celular.
Sílice	Indigestible	
	Indigestible	
Taninos, Aceites esenciales y polifenoles	No aprovechables (absorbidos y excretados como tales)	Inhibidores de proteasas y celulasas.

Van Soest, 1984.

Las lignanas son compuestos de bajo peso molecular químicamente relacionados con la lignina y pueden contener componentes característicos a la lignina. Algunas de las lignanas de los pastos, como los ésteres del ácido ferúlico, pueden ser precursores de ligninas que son de alto peso molecular.

Los taninos son compuestos polimerizados muy solubles comparados con la lignina que es poco soluble. La lignina es el producto más complejo entre una variedad de derivados fenilpropanoides y está formada por unidades de fenilpropano unida fuertemente por enlaces covalentes, con la hemicelulosa y probablemente con la celulosa, la presencia de estos enlaces influyen considerablemente en la disminución de la digestibilidad de esos glúcidos cuadro 4 (53).

Métodos de análisis.

Los métodos de análisis de alimentos, como el Análisis Químico Próximo (AQP), Paredes Celulares o de Van Soest y la Digestibilidad "in vitro" (DIV) o de Tilley y Terry (39), son complementarios y son de los más empleados para predecir el valor nutritivo de forrajes y subproductos a pesar de que presentan desventajas (36, 39, 40, 48, 49).

El método para la medición de los residuos no digeribles en los alimentos, fue desarrollado en Alemania en la segunda mitad del siglo XIX por el método de Weende (1, 50). El Análisis Químico Próximo (AQP) es una combinación de procedimientos analíticos más empleado para caracterizar la composición química inmediata de los alimentos, su estandarización fue llevada a cabo en los E.U., por el A.O.A.C. y desde entonces solo ha sufrido ligeros cambios (33).

Dentro de las determinaciones del A.Q.P. se encuentra la fibra cruda que se determina en el material extraído con éter, hirviendo primero con un ácido diluido (H_2SO_4 al 1.25%) por 30

minutos y después con un álcali (NaOH al 1.25%) por 30 minutos. La fibra cruda es el residuo orgánico remanente estimado de la resta de las cenizas en la muestra por calcinación (48, 51).

En la fracción así denominada se encuentran serias discrepancias entre lo que representa el laboratorio y la utilidad que presta a la nutrición. Hace más de 100 años, se pretendía imitar en esa forma la digestión ácida del estomago y la digestión alcalina del intestino. El residuo suponía que representaba la parte no digerible. En el sistema de Weende la parte digerible que no es grasa, proteína, ni minerales, se determina por diferencia, agregando estos tres grupos mas la fibra cruda y restándolos del peso de la muestra original. Ese valor obtenido por diferencia suponía que incluía glúcidos solubles que también reciben el nombre de extracto libre de nitrógeno. Al ser determinado por diferencia incluye los errores de técnica cometidos en las otras determinaciones. En los laboratorios con experiencia se obtienen resultados muy consistentes, de tal manera que esa objeción no es muy seria. En nutrición humana en que muchos de los alimentos contienen poca fibra, esta no se determina y se estiman todos los glúcidos por diferencia. El problema ocurre con forrajes toscos y la determinación de fibra cruda (1); la idea original de que la fibra cruda representaba la fracción no digerible, está no es verdad. Casi la totalidad de la celulosa estaba en esa determinación, y ella es digerible por los herbívoros. La fibra cruda de la remolacha, por ejemplo, es casi únicamente celulosa, y muy digerible, mientras que en la paja y otros forrajes leñosos contienen la lignina, fracción no digerible (1).

La fibra cruda no representa ninguna identidad química identificable. Pero, como indicadora de la poca calidad en los forrajes es defendible su uso. Su utilidad es variable porque en cada especie y variedad comprende proporciones diversas de compuestos más o menos útiles.

A pesar de haber sido el más utilizado, presenta desventajas en su uso, como la variabilidad en la recuperación de celulosa y lignina (1, 15). El residuo insoluble obtenido contiene aproximadamente 97% de celulosa y lignina, pero no representa el total de esos

componentes. La concentración de celulosa recuperada se encuentra entre el 60 y 80% de la original, y el contenido de lignina puede variar entre 4 y 7%. Durante los tratamientos ácido y alcalino hay degradación oxidativa de la celulosa nativa presente y degradación variable de lignina (15, 48, 50, 51, 52). El método es empírico y requiere un apego total al protocolo para poder obtener resultados reproducibles. Aún así, fue el más aceptado, y sus principios han sido la base del método que se utiliza (30, 50).

El tratamiento alcalino en el procedimiento de Weende, tiene la mayor fuente de variación y pérdida de precisión, sugiriéndose modificaciones, utilizando sólo digestión con ácido. El producto obtenido se denomina fibra dietética o método con detergentes. En el primero, el material total de la pared celular se cuantifica como residuo después de la extracción con una solución detergente neutra. La fibra detergente neutro (FDN) contiene toda la pared celular, excepto los compuestos solubles en agua, e incluye trazas de proteínas asociadas con la estructura de la pared. El segundo método, denominado fibra detergente ácido (FDA) involucra la extracción con una solución de ácido sulfúrico conteniendo bromuro de acetil trimetil amonio, el residuo, fibra detergente ácido, contiene la celulosa y lignina y algunos materiales inorgánicos. La cuantificación de hemicelulosa puede ser obtenida restando el valor FAD del valor FND (15, 43, 50).

Van Soest (1964) ha hecho una revisión de muchas objeciones al concepto y cita los siguientes: En muchos tipos de forrajes, principalmente ensilaje, es tanto o más digerible que los llamados carbohidratos solubles; en estos últimos, la parte no digerible es lignina; la digestibilidad de la fibra no es constante entre especies, o dentro de ellas, pues su naturaleza cambia con la maduración de la planta. En las leguminosas, la fibra cruda mas alta de ciertas variedades, lejos de predecir menor valor o consumo, era asociada con mayor calidad (1).

Muchos sistemas han pretendido mejorar el análisis de tipo Weende, intentando diferenciar la celulosa de la lignina. La lignina es el constituyente principal de las paredes de las células de materia vegetal endurecida o que han dejado de crecer; forma parte de tallos y

partes erectas de las plantas que se denominan lignificadas. Siempre se encuentra algo de nitrógeno en ella, lo importante es que ningún animal de explotación pecuaria posee poder digestivo contra ella y se pensó que sería útil aislarla por métodos químicos, puesto que a mayor cantidad en el forraje, menor calidad, y se tendría así un grado de predicción mayor que con la vieja y mal definida fibra cruda. Uno de los métodos más usados ha sido el de extracción con ácido sulfúrico al 72% o su determinación con permanganato de potasio. Hay pruebas de que la lignina asociada entorpece la digestibilidad de la materia seca de un forraje por el mecanismo de aislar esa materia susceptible de digestión enzimática impedida por las paredes endurecidas de la célula. Cuando se ha obtenido lignina purificada y es agregada en pequeñas cantidades a una ración, no ocurre la depresión de digestibilidad que podía esperarse con una cantidad igual de lignina en un forraje natural (1).

La separación de lignina por medio de ácidos es un proceso tardado y costoso. Otros artificios y errores han sido apuntados por Van Soest (1964), principalmente el hecho de que el calentamiento de la muestra resulte en valores mayor de lignina. En una larga serie de investigaciones, Van Soest (1965, 1966) propone un método de separación detergentes de los componentes de los forrajes en dos grandes porciones: paredes celulares y contenido celular. Todos los elementos de mayor valor quedarían en la categoría de solubles en detergente neutro: lípidos, azúcares, almidón, protefna, nitrógeno no proteico y pectinas (1, 15, 52). En la segunda categoría quedaría la parte insoluble, de la cual el simple procedimiento de disolverla en detergente ácido, dejaría reunidos en una sola fracción a la celulosa, lignina, sílice, queratina, y algo de nitrógeno lignificado. Los valores denominados fibra insoluble en detergentes ácidos, han mostrado utilidad de predicción sobre el valor verdadero de los forrajes. (1).

CUADRO 5.

Porcentajes de lignina, pentosas y celulosa del alimento que son disueltos en la fibra cruda.

CLASE		LIGNINA	PENTOSAS	CELULOSA
Leguminosas	Rango	8 - 62	21 - 86	12 - 30
	Promedio	30	63	28
Pastos	Rango	53 - 90	64 - 89	5 - 29
	Promedio	82	76	21
Otros Pastos y Leguminosas	Rango	10 - 54	43 - 84	7 - 23
	Promedio	52	64	22

Van Soest (1982).

La adaptación de las técnicas de separación de fracciones de Van Soest para forrajes, residuos no convencionales de las cosechas y subproductos agroindustriales, sirven para aclarar el problema de la fracción indigestible de la pared celular y fibra cruda del AQP (9, 54). En el Cuadro 5, se muestran los porcentajes de lignina, pentosas y celulosa del alimento que son disueltos en la fibra cruda.

La determinación del Método Detergente Ácido constituye un paso preliminar para la determinación de la lignina. Se basa en la digestión del material con una solución ácida de un detergente para obtener un residuo formado por celulosa, lignina y sílice (15). El Cuadro 6, muestra el esquema general del análisis para fibra de Van Soest. Las publicaciones originales de 1963 sobre el uso de detergentes en el análisis de alimentos fibrosos, la metodología para determinar fibra y lignina, y la determinación de los constituyentes de las paredes celulares en 1967, son ahora obsoletas y solo de interés histórico. En los procedimientos actuales el trietilen glicol ha reemplazado al 2 etoxi etanol a causa de su toxicidad (54).

Hay necesidad de homogenizar el procedimiento para determinar la fibra detergente neutro y remover el almidón que producen mucha interferencia por medio de amilasas en dietas fibrosas para rumiantes que presentan, además, alto contenido en almidón (54). Para determinar la fibra detergente neutro, una nueva enzima ha sido aprobada por el A.O.A.C., y ha reemplazado a otras amilasas en trabajos analíticos. Esta nueva enzima esta disponible con el numero A 3306[®], (54). El Cuadro 7, muestra algunas modificaciones que se han realizado al método de fibra detergente neutro de Van Soest. La preparación enzimática de *Bacillus subtilis* IV A (XIA) usada en el método original puede ser aceptada. Sin embargo, su calidad y disponibilidad han variado en los últimos años y no es confiable por contener *hemicelulasa* que alteran los resultados (54). Tiene otras desventajas como, baja actividad, teniéndose que emplear mayor cantidad de enzima; activa a 80 C, pero rápidamente inactivada a 100 C. La actividad 1-6 también es destruida por el etilen diaminotetra acético (EDTA) por su sensibilidad al calcio (54).

CUADRO 6.**Esquema general del análisis de forrajes usando detergentes.**

Fracción	Reactivo	Tratamiento	Producto
Residuos del detergente neutro (RDN)	Lauril sulfato de Na, EDTA pH 7.0	Hervir 1 h.	Pared celular de la planta menos las pectinas
Fibra ácido detergente (FAD)	Bromuro de cetil trimetil amonio en H ₂ SO ₄ al 1 N	Hervir 1 h.	Lignocelulosa + mineral insoluble
Nitrogeno indigestible	Ácido Detergente	Determinación de N por el Método de Kjeldahl sobre FAD	Prod. caramelizados (Maillard) y N lignificado
Lignina	72% H ₂ SO ₄ tratamiento al FAD	3 h., 20 min	Lignina cruda
Celulosa	Ninguno	Residuos de cenizas de la lignina	Perdida en peso
Sílice (SiO ₂)	HBr concentrado (48%) trat. a las cenizas de FAD	Cenizas 1 h, 25C	Silicatos residuales
Hemicelulosa	Ninguno	Calculado como FND-FAD.	

Van Soest (1982).

En reciente análisis secuencial propuesto por Van Soest en 1991 para fracciones de fibra, utilizando la α -amilasa A-3306 las interferencias importantes que causaba el almidón, pueden suprimirse y es además, más económico (54).

La α -amilasa A 3306 es termoestable y resistente cuando se hierve junto con la muestra en el método fibra detergente. Es usada para degradar el almidón en los métodos químicos donde no se usa detergente en dietas con fibra. El uso de temperaturas altas con esta amilasa termoestable, tuvo la ventaja de minimizar los efectos no deseados y acortar el tiempo de análisis (49). Otra alternativa para el análisis de fibra detergente neutro en alimentos con alto contenido de almidón, es el uso de enzimas termoestables que son usadas en la industria. El Takatherm[®] es el nombre comercial de otra α -amilasa termoestable a más de 100 °C, que se obtiene del *Bacillus licheniformis* y que tiene acción sobre la dextrina. El nivel adecuado de esta enzima para hidrolizar el almidón, varía con el sustrato, equipo y procesamiento de hidrólisis (38, 41).

La medición de azúcares reductores totales por el método de Fehling modificada por Lane-Eynon, es un método con el que se determinan los azúcares reductores directos y la sacarosa. La base química es que los azúcares que contienen en su estructura grupos aldehídicos o cetónicos libres reaccionan como agentes reductores débiles y se denominan azúcares reductores, que incluyen todos los monosacáridos y los disacáridos maltosa, lactosa y celobiosa. En el caso de la sacarosa es un azúcar no reductor, pero sí se hidroliza se separa en sus monosacáridos reductores. En la prueba se efectúa una reducción del ión cúprico completado con el ión tartrato en medio alcalino (azul) a ión cuproso (rojo ladrillo) que precipita. Se usa azul de metileno (4 gotas) como indicador interno. El aire se elimina de la mezcla reaccionante manteniendo el líquido hirviendo durante la valoración (24).

CUADRO 7.

Modificaciones al Método de Fibra Neutro Detergente.

FUENTE	CONDICIONES
Van Soest y Wine (1967)	D.N. Hervido durante 1 h mas sulfito y decalina.
Fonnesbeck (1976)	Pepsina pH 2.2, 40 h a 55 C, hervir con detergente pH 3.5.
Kind y Taverner (1975)	Hervor con D.N. 2 h.
Schahler (1976)	Pretratamiento con enzima pancreática de cerdo
Robertson y Van Soest (1981) y Mongeau y Brasard (1982)	D.N. hirviendo 30 min.; agitando y agregando amilosa, rehervir 30 min, suprimiendo la decalina sulfito.
Giger et al. (1981)	Hervir en agua 30 min, incubar 80 C con amilasa 30 min, hervir con DN 1 hora sin sulfito ni decalina.
Wainman et al. (1981)	Reposar toda la noche con amilasa 38 C y hervir con DN durante 1 h sin sulfito ni decalina.
McQueen y Nicholson (1979)	Similar a la anterior pero con menos enzima
Wainman (1981) modificado por Mascarenhas-Ferreira et al. (1983)	Incubar con amilasa toda la noche hervir con D.N. durante 1 h sin decalina ni sulfito.
Idem	Incubar 30 min a temperatura ambiente y hervir por 1 h con DN.
Mascarenhas-Ferreira et al. (1983).	FDN con EDTA + enzima incubado 15 min. en el medio ambiente, hervir 1 h y agregar EDTA 5 min. antes de retirarlo.

Van Soest (1991)

idem: Igual que el anterior , quitando DN + EDTA y agregando decalina y sulfito

Sills et. al (1982): El almidón gelatinizado, amilasa a pH 4.6 incubado toda la noche a 38 C, hervir DN por 1 h. sin sulfito ni decalina.

Jeraci et. al. (1988): Agregar 0.25 ml de termamil 20* y hervir con ND por 1 h.

Van Soest y Robertson (1985): Empapar la muestra en una solución de urea al 8 M más 0.2 ml de termamil 21 incubando 3 hs al medio ambiente, diluir en solución DN, hervir 1 h y filtrar.

* Termomil 20: Sigma amilasa III 5426 (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.)

En la determinación de almidón integro por el método de Street y Closse¹ que tiene como base que la α -amilasa se degrada el almidón formando dextrinas reductoras y azúcares reductores de bajo peso molecular. La amilosa, sirve de sustrato para la determinación de la actividad amilásica. Al cabo de un tiempo, la reacción con α -amilasa se compara con el blanco la coloración azul del problema que se forma por la adición de yodo (solución 0.008 N) haciendo la lectura en un fotocolorimetro con absorbancia a 620 nm. Como la disminución de la extinción (absorción) de luz es proporcional a la cantidad de sustrato degradado, es posible calcular la actividad amilásica o la presencia de almidón no degradado.

En un trabajo hecho por Plata y col (1992), se determinó el efecto de las α -amilasas Sigma Chemical No. 3051, α -amilasa Takatherm L-340, y Díazime L-200 en la determinación de fibra detergente neutro de paja de avena y celulosa pura como ingredientes fibrosos y desecho de panadería (50%) más paja de avena (50%) como ingredientes con almidón y fibra. Los tratamientos fueron solución detergente neutro más Takatherm (0.05 ml), solución detergente neutro más Takatherm (0.1 ml), solución detergente neutro más Takatherm (0.15 ml), solución detergente neutro más Díazime (0.05 ml), solución detergente neutro Díazime (0.15 ml), solución detergente neutro más Díazime (0.15 ml) adicionados a 30 minutos de iniciada la digestión que duro una hora (30).

Los resultados con ingredientes fibrosos no indicaron diferencias con o sin enzimas. Con desperdicios de panadería solo o con paja de avena hubo diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos. Para desperdicio de panadería donde hubo mayor porcentaje de fibra detergente neutro fue en solución detergente neutro y solución detergente neutro mas 0.15 ml de Díazime. Los de porcentajes intermedios fueron: solución detergente neutro más 0.1 y 0.15 ml d Díazime y los de menor fibra detergente neutro fueron solución detergente neutro más 0.1 y 0.15 ml de Takatherm y solución detergente neutro más 0.15 ml de Takatherm y

¹ Street, H, V.; Close J. R.; Clin. Chim (1956) 1 256 (1958), 3 476 reportados en Catalogo Merk (para determinación de Merckotest.)

Diazime. Para el desperdicio de panadería más paja de avena los tratamientos con mayor fibra detergente neutro fueron los de solución detergente neutro, solución detergente neutro más 0.05, 0.1 y 0.15 ml de Diazime, el intermedio fue el de solución detergente neutro más alfa-amilasa y los de menor fibra detergente neutro fueron solución detergente neutro más 0.1 y 0.15 ml de Takatherm y solución detergente neutro más 0.15 ml de Takatherm y Diazime respectivamente (38).

Ninguna de las enzimas degradó ingredientes fibrosos, considerándose que las diferencias obtenidas en la digestión de ingredientes con almidón se debe a la digestión de glúcidos no estructurales digeridos. Con esas observaciones los autores concluyen que el uso de la α -amilasa 3051 o niveles bajos de Diazime tienen poca capacidad de solubilidad del almidón y pueden sobrestimarse los resultados de los estudios donde se determina la fibra detergente neutro en dietas que contengan almidón (30).

Se indica también que el uso de 0.1 a 0.15 ml de Takatherm solo o combinado con diazime (0.15 ml) solubilizan la mayor cantidad de almidón y permiten estimar la fibra detergente neutro adecuadamente en sustratos con almidón (38).

Características Generales del Takatherm L-340®^{2, 3}

Es una α -amilasa de origen bacteriano, identificada químicamente como E.C.3.2.1.1. 1, 4 α -D-Glucan glucano hidrolasa, y se obtiene por la fermentación del *Bacillus licheniformis*; caracterizada por su acción amilolítica sobre la dextrina. Es una endo amilasa capaz de romper los enlaces α -1,4 glucosídicos del almidón, glucógeno y sus productos de degradación. La viscosidad del almidón gelatinizado es rápidamente eliminado, y la hidrólisis inicial es sobre dextrinas y oligosacáridos en solución. La hidrólisis prolongada da como resultado la liberación de glucosa y maltosa. El Takatherm ha mostrado alta estabilidad a

² Chaing, J. P.; Alter, J.E., and Sternberg, M.: Purification and Characterization of a Thermostable α -amilase from *Bacillus licheniformis*. Starch/Starke 31, 86-92 (1979). Reportado por Solvay Enzymes, Inc.

³ Takatherm también conocido como Thermazin-340.

temperaturas de ebullición, donde también propicia el eficiente rompimiento de los enlaces del almidón. Está prácticamente libre de actividad sobre las proteínas, evitándose así el problema durante la licuefacción del almidón (41).

No necesita cofactores para su activación, aunque es una metaloproteína del Ca, siendo necesarios éstos iones como cofactores para su mejor estabilidad. Los iones de Ca no forman parte del almidón hidrolizado, pero estabilizan la estructura de la molécula de la proteína para mantener la configuración de la enzima activa (41). El Ca unido fuertemente a la enzima, permite estabilidad a altas temperaturas y a pH extremos sin que sufra desnaturalización. Para el rompimiento de los enlaces del almidón se indica la adición de 50 a 200 mg/l (ppm) de iones de Ca, suficiente para estabilizar la enzima (41).

La actividad del Takatherm se puede expresar en unidades modificadas de Wohlgemuth (MWU), que es la cantidad de enzima dextrinizante capaz de romper un miligramo de almidón en solución, de una cantidad determinada de dextrina en 30 minutos bajo condiciones de laboratorio. La solución está a una concentración de 4.65 %.

El rango óptimo de pH para esta enzima es de 5 a 7. En presencia de 35% de almidón puro de maíz en base a sólidos secos (BS), la enzima ha demostrado máxima hidrólisis por encima del rango de pH de 6 a 6.5 a 90 C, siendo disminuida la hidrólisis en los extremos. Es estable en soluciones con rangos de pH de 5 a 11, cuando la temperatura se encuentra a 25 C.

A un pH de 6, su temperatura óptima es de 90 C en presencia de 10 mg/l (ppm) de iones de Ca. En presencia de altas concentraciones de almidón (10 a 50 % BS) y suficientes iones de Ca soluble (50-75 mg/l), es termoestable e hidrólisis en forma eficiente del almidón a elevadas temperaturas. A temperaturas por debajo de los 20 C con pH de 6 a 6.8 existe alta estabilidad enzimática. Con pH entre 5 y 8, el rango óptimo de temperatura es de 90 a 95 C, as

temperaturas sobre los 95 C aún cuando sobrepasan los 100 C, ocasionan un acelerado nivel de hidrólisis del almidón, pero disminución en el grado de activación enzimática (41).

Los iones de metales como el cobre, hierro y cobalto, inhiben moderadamente la actividad de la enzima. El aluminio, plomo y zinc la inhiben fuertemente. Como en todas las metaloproteínas el E.D.T.A ejerce un efecto negativo sobre ésta. La enzima es completamente miscible en agua y se usa para licuar la malta, cebada, maíz, sorgo, papa y otros productos obtenidos de los granos de cereales, en procesos industriales (41).

El nivel adecuado de esta enzima para la licuefacción del almidón varía con el sustrato, condiciones de equipo y procesamiento de licuefacción. Tomando en consideración lo anterior se recomienda utilizar el Takatherm L-340 de 0.25 a 0.75 l/1000 kg de almidón BS (equivalente a 85 000 y 255 000 mwu/kg de almidón BS respectivamente con una actividad de 340 000 mwu/ml), realizando determinaciones con diferentes tipos de muestras que permitan estandarizar la modificación (41).

MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., en colaboración con el Programa de Ganadería del Colegio de Posgraduados en Montecillo, México.

El estudio consistió en evaluar la enzima amilolítica α -amilasa del *Bacillus licheniformis* Takatherm L-340® con la finalidad de sustituir la α -amilasa Sigma A-3306® empleada en el método de Fibra Detergente Neutro (FDN) de Van Soest (1991).

En general para todos los experimentos se tomaron como base los pasos recomendados en la técnica de microdigestión para FDN propuesta por Waldern (1971) (55).

Las enzimas empleadas fueron la α amilasa del *Bacillus liqueniformis* (Takatherm (TK)) y la de Sigma A-3306 y como sustratos el almidón puro de maíz, granos de sorgo y maíz molidos en criba de 0.1 mm y tamizados en malla Num. 40, abertura de 38 mm. Soluciones de 30 ml de agua destilada a pH 7 y adicionadas con 200 ppm de iones de calcio (usando como fuente el cloruro de calcio) en tubos de ensaye de 175 x 2 cm y de 20 x 3.5 cm, tapados con canicas de vidrio o tapas de plástico atravesadas con una aguja hipodérmica que evitaba la presión interna por vapor. Como fuente de calor un recipiente de 10 litros con agua en ebullición para baño maría (93-95 C). La temperatura interna en los tubos oscilo entre 90 a 93 C:.

Entre el equipo y material de laboratorio se incluyen la balanza granataria eléctrica, potenciómetro, molino Wiley, fotolorímetro (espectrónica 21 D), buretas, matraces, etc.

Para determinar presencia de almidón puro de maíz se usó la prueba de lugol (yodo) en forma visual y mediante el reactivo comercial (Merk-Test 32*) por adición de 3 gotas a la

solución problema (50). Para la filtración se empleó papel whatman No. 5 en embudos de plástico.

La desaparición de sustrato (digestibilidad) del papel filtro por efecto de las enzimas y la solución de fibra detergente neutro (SFDN), se calculó por diferencia de peso, empleándose estufa a 60 C.

Para la presencia del almidón en el líquido sobrenadante se usó el fotocolorímetro ajustado a una absorción de luz de 620 nanómetros (nm) para detectar coloración azul. La técnica recomienda 5 ml de éste, agregándosele 0.5 ml de solución de lugol, se dejó reposar 10 minutos y se mide en el fotocolorímetro. Los 5 ml se restituyeron al tubo de donde se habían obtenido. Para la comparación se hicieron curvas patrón con diluciones hasta 0.000001 en líquido sobrenadante de solución de almidón hervido (1%) en agua.

En pruebas para determinar azúcares reductores se empleó la técnica de Fehling modificada por Lane-Eynon, consistente en que el filtrado de 65 ml se llevó a 250 ml con agua para titular la solución de Fehling en ebullición, hasta un cambio de coloración rojo ladrillo, usando como indicador interno 4 gotas de azul de metileno. Los mililitros gastados del filtrado neutralizan los 10 ml de la prueba de Fehling, que equivalen a 0.05 g. de azúcares reductores y en los que por proporción se obtuvo el nivel de azúcar reductor presente en la prueba (50).

En todas las pruebas del experimento el filtrado se hizo sin bomba de vacío, midiéndose el tiempo de filtración.

El trabajo experimental se dividió en cuatro etapas:

Primera etapa

En ensayos preliminares se probó la actividad enzimática del Takatherm con niveles superiores de los recomendados por el laboratorio (0.75 litros por 1000 kg. de almidón en

base seca) que equivalen a 0.0000007 ml para 1 gramo, descartando aquellos donde, por adición de 3 gotas de lugol (yodo), se demostraba su presencia al tomar la coloración azul. Se efectuaron tres pruebas de desaparición para corroborar las observaciones y efecto del pH.

En el primer ensayo se midió la desaparición de 1 gramo de almidón con 0.25 ml de TK a 30 minutos de ebullición con pH 7 y 5.8. Con objeto de observar retención en el filtro de residuos enzimáticos, se incluyó un ensayo sin almidón a pH 7.

El segundo ensayo consistió en medir dos niveles de Takatherm (0.0075 y 0.01 ml) sobre la desaparición de tres niveles de almidón (0.1, 0.7 y 1.3 g) a 15 minutos de ebullición en agua.

El tercer ensayo tres consistió en medir la desaparición de diferentes niveles de almidón: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 y 1.1 g a una dosis baja (0.075 ml) y alta (0.3 ml) de Takatherm a 15 minutos en ebullición con agua.

Segunda etapa.

Esta constó de tres experimentos donde se usaron niveles de Takatherm y almidón por arriba de 0.1 g y 0.1 ml en agua y bajo las mismas condiciones que en la primera. Se hicieron pruebas de desaparición de almidón (digestibilidad), presencia de residuos de almidón íntegro en el líquido sobrenadante de las muestras tratadas con pruebas de lugol y fotocolorimetría y presencia de azúcares reductores en el líquido filtrado con la prueba de Fehling (Lane-Eynon).

En el ensayo uno se determinó la desaparición de 1 gramo o menos de almidón a 10 niveles de Takatherm superiores a 0.1 ml: (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5 y 1.6 ml) a 15 minutos de ebullición. La reacción a concentración de 0.075 se incluyó como referencia.

El segundo ensayo consistió en seis niveles de Takatherm L-340® (0.075, 0.1, 0.5, 0.9, 1.3 y 1.6 ml) sobre 1 g de almidón a tiempos de 15 y 30 minutos de ebullición.

En el tercer ensayo, se estudiaron los efectos de tiempo y enzima en la desaparición en 1 g almidón con 3 niveles de Takatherm L-340® (0.1, 0.3 y 0.5 ml) en 4 tiempos de ebullición: 5, 10, 15 y 30 minutos.

En el cuarto ensayo integró se incluyeron 5 niveles de Takatherm L-340® (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml) con 5 de almidón (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 gramos de almidón) a 30 minutos de ebullición.

Tercera etapa

En la tercera etapa se efectuaron 3 experimentos, empleándose 0.25 ml de Takatherm en 1 g de almidón o gramo de sorgo molido (criba de 0.1), con objeto de encontrar las condiciones de la solución de FDN para usarse con el Takatherm L-340®.

Se probaron las dos modalidades (técnicas): predigestión en agua por 30 minutos y FDN modificada para corroborar que no había diferencia entre ellas. Usando 1g de sorgo molido con 0.25 ml de Takatherm L-340®.

En la primera técnica se sometió a predigestión de 0.25 ml de TK con un gramo de almidón en 20 ml de agua y en ebullición durante 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, al concluir el tiempo se agregaron 100 ml de solución FDN de Van Soest (1967) y se mantuvo por 60 minutos en ebullición. Se incluyó una prueba a cero minutos con la misma cantidad de enzima.

En un segundo experimento se agregaron los componentes de la fibra detergente neutro (FDN) en polvo y en la solución para efectuar la predigestión del sorgo por 30 minutos por acción del Takatherm L-340®. También se incluyó un ensayo sin predigestión con 100 ml de solución FDN modificada que consistió en agregar el ácido etilén dinitrilo tetracético

(EDTA) a los 55 minutos de que empieza la ebullición de la solución de fibra detergente neutra a la que se agrega la enzima y se ajusta a un pH neutro.

A todas la pruebas de esta etapa se le hicieron las mismas determinaciones que en la segunda etapa.

Cuarta etapa.

En una cuarta etapa se validó la acción amilolítica del TK como sustituto de la A-3306® (0.25 ml) en pruebas con un gramo de sustrato (granos de sorgo y maíz finamente molido y almidón puro de maíz), mediante las pruebas de predigestión y con la de solución de fibra detergente neutro modificada sin predigestión .

Se midieron por separado las dos técnicas para buscar el efecto amilolítico de las dos enzimas: TK vs A-3306 sobre sorgo y maíz molido y almidón puro de maíz. El nivel de las enzimas fue de 0.25 ml (equivalente a 85 000 unidades modificadoras de Wolghemuth) sobre 1 gramo de sustrato.

En el primer experimento se midió con la técnica modificada de FDN la acción amilolítica del Takatherm L-340® y la A-3306® sobre los granos de sorgo, maíz y del almidón.

En el segundo experimento con la técnica de predigestión en agua, se midió el efecto amilolítico de las dos enzimas sobre los sustratos en cuestión.

Preparación de Fibra Detergente Neutro:

Por separado se agrega en tres matraces: 18.61g EDTA disodica y 6.81 g de Tetraborato de Sodio $1 \text{ H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua; 30 g de Lauril sulfato de sodio y 10 ml de Etilenglicol monoetileter, 200 ml de agua; 4.5 g de fosfato de sodio bibásico anhidro en 100 ml de agua. En otro matraz con capacidad para 2 litros se mezclan los tres, se calienta para disolver, se

enfria y se lleva a 1 litro con agua destilada. Se utilizan 10 ml de la mezcla FDN por cada 0.1 g de muestra y se hierve durante 60 minutos (53, 54).

Prueba de Fehling (Lane-Eynon) (19):

Para preparación de los reactivos de Fehling se emplean dos soluciones: para la "A" se agrega 69.278 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua y se filtra. Para la solución "B" se agrega 346 g de sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio $\text{KNaC}_2\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) mas 100 gramos de hidróxido de sodio en 1 litro de agua destilada y se filtra.

Titulación: Se llena una bureta con la solución problema y se ajusta el nivel del líquido a la marca cero.

En un matraz erlenmeyer de 250 ml se colocan 5 ml y 54 ml de las soluciones "A" y "B" se agitan y se agregan 65 ml de agua destilada y 5 perlas de vidrio. Se coloca el matraz en la fuente de calor y cuando el líquido este en ebullición lenta se titula (1 ml cada 15 segundos), con la solución problema de la bureta, manteniendo la ebullición. Al observarse enturbamiento del color azul agregar 4 gotas de azul de metileno. Se continua la titulación hasta que la solución queda incolora y se vea claramente el precipitado rojo de oxido cuproso. Se anota el volumen gastado que debe estar entre 15 y 50 ml. Debido a que 10 ml de Fehling requieren 0.05 g de azúcar invertido para su total reducción, por proporción:

Volumen gastado	0.05 g
250 ml (volumen total de la muestra)	X =

Estadística.

Todas las pruebas se hicieron con 3 repeticiones (cada una en día diferente), con dos tubos (submuestras) en cada prueba. Usando la interacción bloque por tratamiento como error experimental para tratamiento

Las pruebas se analizaron estadísticamente para un diseño con bloques generalizados completamente al azar, empleándose el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) (17).

El arreglo de tratamientos para cada prueba dependía del nivel de enzima, almidón o tiempo de ebullición, haciendo la partición de los grados de libertad correspondientes donde para cada observación se empleo el siguiente modelo (17, 28):

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \beta_j + R_{ij} + T_i * B_i \quad y = 1, 2, \dots, r. \quad j = 1, 2, \dots, t.$$

Donde;

Y_{ij} = Variable respuesta en tratamiento y, repetición.

μ = Media general

t_i = Efecto de tratamiento y

β = Efecto de bloque j

R_{ij} = Error de muestreo.

E_{ij} NI $(0, \sigma^2)$

$T_i * B_i$ = Interacción bloques tratamiento (error experimental)

RESULTADOS

Se abordan, los resultados de la primera a la cuarta etapa, por la relevancia en el trabajo, solo se incluyen los cuadros de desaparición del almidón en el filtro. Los azúcares reductores y almidón sobrenadante en fotocolorímetro, se incluyen únicamente en la cuarta etapa, por no ser concluyentes del mismo de trabajo como el de la desaparición. Los cuadros de análisis estadísticos se encuentran en el apéndice I.

Primer Etapa:

En los ensayos preliminares las recomendaciones del laboratorio fueron insuficientes para disolver al almidón ya que se formó un gel (engrudo) que no permitía la digestión completa del mismo. De estos ensayos se concluyo que era conveniente concentraciones de almidón de 1 g o menos, para los ensayos posteriores.

En los resultados de la primera etapa del trabajo, valores de 0.007 ml hasta menos de 0.1 ml de Takatherm indicaron digestión alta del almidón (no mayor a 1 g) pero en la prueba de lugol se presentaban tonalidades azulosas muy ligeras, indicio de almidón sin degradar, descartándose esos niveles para pruebas posteriores. Los valores enzimáticos superiores a 0.5 ml, eran eficientes para degradar almidón como aquellos entre 0.1 a 0.5, con el inconveniente de mayor uso de enzima y la presencia de una suspensión blanquecina parecida a la clara de huevo desnaturalizada (después de 15 minutos de ebullición) que flotaba en la superficie del líquido y quedaba adherida en las paredes del tubo. Este fenómeno era creciente y apreciable a partir de 0.5 ml de enzima y se supuso (no comprobado) que la enzima se desnaturalizaba, decidiéndose probar solo concentraciones de 0.1 a 0.5 ml.

Niveles de almidón en solución superiores a 1 g pueden ser degradados con una cantidad adecuada de enzima, pero como el objetivo fue usar la enzima en el método de fibra detergente neutro, donde se usa 1 gramo de muestra (forraje), se consideró que la

cantidad máxima de almidón a degradar no rebasaría ese valor, y después de probar entre 0.1 a 1.0 g, entre los que no se encontraron diferencias, se tomó el último para las pruebas subsiguientes.

El tiempo de filtrado, sin uso de bomba de vacío, fluctuó entre 5 y 10 minutos. En pruebas iniciales se incluyeron grupos control con almidón sin la enzima, siendo su filtración imposible, aún con bomba de vacío; en algunos casos se dejó al medio ambiente pero la desaparición de la humedad era por evaporación y no por el filtrado, tardando mas de dos o tres días en ello.

En el Cuadro 8 se observa la digestibilidad del almidón con 1.25 ml de Takatherm en un pH 7.0 y 5.8 no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de bloque (96.84 y 96.43%) pero las hubo ($p < 0.05$) en el pH neutro con 97.02% y el de pH 5.8 con 93.02%. También se incluyó un tratamiento sin almidón, solo Takatherm en la solución a pH 7, en éste la recuperación fue de 99.86%.

CUADRO 8.

Desaparición del almidón (1 g) con Takatherm (0.25 ml) a pH neutro y ácido en agua a 30 minutos.

Takatherm + H ₂ O (Ca ⁺⁺) pH 7	Takatherm + H ₂ O (Ca ⁺⁺) + Almidón pH 7	Takatherm + H ₂ O (Ca ⁺⁺) + Almidón pH 5.8
99.75	99.10	93.80
99.82	95.12	92.62
100.00	96.38	93.73
99.90	98.96	91.21
99.89	94.70	94.20
99.78	97.88	92.58
Prom.99.86a	97.02a	93.02b

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 1.31

En el Cuadro número 9 se presentan los resultados de pruebas con niveles bajos de Takatherm con 3 niveles de almidón, donde al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) por ningún factor .

CUADRO 9.

Efecto de dos niveles de Takatherm L-340® sobre la desaparición en tres niveles de almidón a 15 minutos de ebullición en agua.

Takatherm (ml)	Desaparición (%) del almidón (g)			
	0.1	0.7	1.3	Promedio
0.0075	65.20	87.96	89.96	
	66.00	88.20	89.20	
	89.88	95.50	87.36	
	87.40	94.10	88.30	
	85.80	90.75	87.97	
Promedio	85.10	93.30	86.90	86.64 a
	80.00	91.64	88.28	
0.01	82.80	90.40	85.20	
	89.70	92.45	86.17	
	98.40	90.18	82.13	
	95.10	88.31	87.72	
	53.40	85.57	80.02	
Promedio	88.14	93.97	83.10	86.27 a
	84.59	90.45	84.07	
Promedio	82.24 a	90.89 a	86.17 a	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 10.05

Los resultados presentados en el Cuadro 10, tampoco muestran diferencias estadísticas ($p > 0.05$), entre los promedios de desaparición por nivel de Takatherm 92.69% (0.3 ml) y 92.43% (0.075 ml), y tampoco en los niveles de almidón hubo esas diferencias, donde la desaparición fue de 92.09% a 95.96% progresivamente con los niveles de almidón, salvo en el nivel inferior de 0.1 g (82.49%) donde se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con los demás promedios.

CUADRO 10.

Desaparición de diferentes niveles de almidón con dos de Takatherm L-340@ a 15 minutos de ebullición en agua.

TK (ml)	Desaparición (%) del almidón (g)						
	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	Promedio
0.3	65.00	94.00	93.80	94.70	96.60	96.36	
	85.20	93.22	94.10	94.00	95.80	97.10	
	87.00	90.67	93.20	94.28	95.11	96.72	
	89.81	92.14	90.20	92.80	95.30	96.50	
	90.01	92.69	93.62	93.12	94.90	97.30	
	88.72	93.50	93.50	93.70	94.70	97.40	
Promedio	84.29	92.62	93.07	93.77	95.40	96.90	92.69 a
0.075	87.00	91.00	92.60	99.43	96.44	94.64	
	88.70	92.40	91.80	98.80	96.40	94.10	
	72.00	91.00	96.20	95.14	94.89	94.90	
	79.20	90.60	97.10	95.10	93.80	95.00	
	79.00	92.10	93.40	98.15	97.20	95.30	
	78.20	91.80	92.80	97.70	97.30	96.20	
Promedio	80.68	91.48	93.98	97.38	95.00	95.02	92.43 a
Promedio	82.49 b	92.09 a	93.53 a	95.58 a	95.70 a	95.96 a	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 3.48

Segunda Etapa.

Los resultados de la etapa dos del trabajo, se explican en los Cuadros 11 y 12.

Los resultados de pruebas con 0.075 a 1.6 ml de Takatherm sobre un gramo de almidón por 15 minutos de ebullición en agua, se presentan en el Cuadro 4 donde al análisis estadístico muestra que no hay diferencias estadísticas por efecto del nivel del Takatherm ($p>0.05$) entre los seis tratamientos, encontrándose desaparición de 91.42% a 93.97%.

CUADRO 11.

Desaparición de 1 gramo de almidón por efecto de diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua.

	Desaparición (%) a diferentes niveles de TK (ml)									
	0.075	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.6
	90.57	91.32	91.05	96.36	89.68	93.32	93.25	92.19	91.30	93.01
	94.53	92.81	95.08	94.02	94.87	96.11	91.12	92.68	93.83	90.88
	92.10	91.88	90.88	92.50	93.35	92.00	93.11	94.65	90.12	92.70
	89.93	92.18	92.34	94.56	93.00	94.81	90.15	90.39	96.90	93.67
	92.01	92.00	89.88	88.50	92.78	92.45	90.00	91.77	92.17	92.91
	93.34	93.10	89.50	95.00	92.70	95.15	89.87	92.20	92.36	93.46
Prom	92.08a	92.21a	91.46a	93.49a	92.73a	93.97a	91.42a	92.31a	92.79a	92.77a

Literal diferente indica diferencias significativas ($p<0.05$).

C.V.: 1.77

En el Cuadro 12 se presentan los resultados de desaparición del almidón con niveles de Takatherm entre 0.075 ml hasta 1.6 ml en 1 gramo de almidón a 15 y 30 minutos de ebullición en agua. Al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) por efecto de tiempo o enzima, teniéndose que la desaparición promedio para los

dos tiempos de 15 y 30 minutos fue 92.77 y 92.72% respectivamente y para los niveles de Takatherm el porcentaje promedio varió de 92.33 a 92.96% en los seis tratamientos.

CUADRO 12. Desaparición de 1 gramo de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 y 30 minutos de ebullición con agua.

Tiempo	Desaparición (%) a diferentes niveles de TK(ml)						Promedio
	0.075	0.1	0.5	0.9	1.3	1.6	
15 min.	90.57	91.32	96.36	93.32	92.19	93.01	
	94.53	92.81	94.02	96.11	92.68	90.88	
	92.10	91.88	92.50	92.00	94.65	92.70	
	89.93	92.18	94.56	94.81	90.39	93.67	
Promedio	92.01	92.00	88.50	92.45	91.77	92.91	
	93.34	93.10	95.00	95.15	92.20	93.46	
	92.08	92.22	93.49	93.97	92.31	92.77	
	92.81 a						
30 min	94.25	94.84	95.40	94.72	93.97	94.75	
	94.28	95.28	95.10	95.29	94.90	94.20	
	96.40	94.35	93.80	92.50	94.14	93.90	
	93.90	93.55	91.10	93.40	95.00	94.10	
Promedio	91.10	93.30	94.06	90.62	87.30	87.94	
	93.10	87.61	91.90	82.35	88.80	86.75	
	93.84	93.16	93.56	91.48	92.35	91.94	
	92.72 a						
Prom.	92.96 a	92.69 a	93.53 a	92.73 a	92.33 a	92.36 a	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 2.89

Al evaluar a diferentes tiempos y niveles de Takatherm en agua, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) por nivel de Takatherm (0.1, 0.3 y 0.5 ml) con valores promedio de 88.76, 87.90 y 88.56 % respectivamente, Cuadro 13. Por efecto de tiempo se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre el de 15 minutos con (92.86% de desaparición) con los demás tiempos.

CUADRO 13
Desaparición de 1 g de almidón a 3 niveles de Takatherm L-340® y a 4 tiempos de ebullición en agua.

TK/minutos	Desaparición (%) a 4 tiempos (min)				
	5	10	15	30	Promedio
Takatherm (ml)					
0.1	88.86	86.46	91.32	91.94	
	89.00	87.16	92.14	92.88	
	90.60	83.58	91.88	85.87	
	89.00	84.52	92.18	86.45	
	85.88	88.03	92.00	86.36	
	86.00	88.00	93.10	87.06	
Promedio	88.22	86.29	92.10	88.43	88.76 a
0.3	90.29	87.38	91.05	89.21	
	91.11	88.01	92.00	87.27	
	85.05	85.37	95.08	84.32	
	84.32	84.45	91.82	85.44	
	81.99	81.87	94.02	92.33	
	82.00	80.87	91.11	93.00	
Promedio	85.78	84.80	92.51	88.60	87.90 a
0.5	90.66	88.99	96.36	87.77	
	91.19	87.82	98.03	90.13	
	80.28	86.61	94.02	79.88	
	82.00	86.78	95.02	78.99	
	87.71	88.97	91.30	86.06	
	88.14	89.17	92.12	87.35	
Promedio	86.67	88.06	94.48	85.04	88.56 a
Promedio	86.89 b	86.39 b	92.86 a	87.37 b	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 3.72

En Cuadro 14 se muestra la desaparición de 5 niveles de almidón (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0) por 5 de Takatherm (0.1, 0.2, 0.3, 0.4. y 0.5) donde no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$), en ninguno de los casos.

CUADRO 14.

Desaparición de diferentes niveles de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 30 minutos de ebullición en agua.

Almidón	Desaparición (%)									
	Takatherm L-340 ®(ml)									
	0.1		0.2		0.3		0.4		0.5	
0.2 g	79.50	82.60	62.75	78.65	95.29	96.31	95.14	94.35	95.58	95.18
	85.25	89.60	89.80	84.35	80.25	84.20	75.40	77.10	82.35	80.40
	80.45	85.80	73.30	81.65	77.20	74.05	80.10	84.80	72.90	82.00
Prom	83.87 a		80.06 a		79.95 a		77.48 a		78.58 a	
0.4 g	72.98	84.12	63.57	62.77	62.47	74.52	91.35	93.86	71.63	89.73
	92.23	89.50	89.73	85.05	90.95	90.30	85.35	84.05	85.85	82.78
	90.65	79.45	74.55	85.32	81.35	79.87	82.28	78.57	85.30	90.72
Prom	84.29 a		84.00 a		83.24 a		82.21 a		81.78 a	
0.6 g	88.68	76.40	83.48	84.35	85.83	82.47	91.51	87.58	87.79	91.17
	91.53	84.03	92.02	88.35	87.48	89.53	90.45	89.88	83.45	89.92
	83.48	92.02	90.63	93.43	84.13	87.62	91.47	91.85	89.42	78.65
Prom	86.86 a		86.23 a		82.62 a		88.13 a		85.23 a	
0.8 g	84.35	71.54	66.73	65.56	73.22	73.89	97.98	83.91	73.14	79.12
	91.60	87.18	86.15	87.33	87.81	91.64	85.50	93.14	92.76	90.00
	93.01	93.91	86.79	93.89	86.96	91.49	92.46	90.02	83.58	85.18
Prom	87.00 a		88.07 a		79.19 a		88.83 a		86.18 a	
1.0 g	67.01	75.13	71.33	68.40	70.24	72.49	84.05	75.22	78.47	78.43
	87.47	87.15	89.82	90.44	88.74	85.76	87.61	91.66	91.14	89.97
	92.90	94.10	90.47	97.30	94.82	92.81	74.17	95.32	85.00	91.48
Prom	87.79 a		87.96 a		84.15 a		84.67 a		85.75 a	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 9.79

Tercer Etapa.

En el Cuadro 15 donde se muestra la desaparición de un gramo de almidón por efecto de la solución FDN previa digestión en agua a diferentes tiempos de ebullición, el análisis estadístico por efecto de tiempo, en el de cero minutos, con 32.12% promedio de digestibilidad y el de 10 minutos, con 49.97% , muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí y con los demás tiempos. Para 15, 20, 25 y 30 minutos con 79.05, 80.76, 84.02 y 87.35 % de digestibilidad promedio, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$).

CUADRO 15.

Desaparición de 1 g de almidón en solución de Fibra Detergente Neutro con predigestión con 0.25 ml de Takatherm L-340® a diferentes tiempos de ebullición en agua.

	Tiempo (minutos)					
	Desaparición (%)					
	0'	10'	15'	20'	25'	30'
	38.49	56.10	81.29	88.75	78.75	89.21
	22.12	54.31	77.16	81.93	82.29	87.17
	40.89	40.30	89.41	90.57	90.40	84.32
	38.72	59.43	87.57	86.38	89.21	83.88
	25.59	31.65	63.42	62.17	81.03	92.33
	23.95	46.03	75.42	74.16	82.41	97.11
Prom.	32.12 c	47.97 b	79.05 a	80.66 a	84.02 a	87.35 a

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 12.70

En el cuadro 16 que muestra resultados de predigestión de 1 gramo de sorgo a 30 minutos mas ingredientes para FDN en polvo y en solución, y otro tratamiento con solución

FDN modificado (pH 7 sin EDTA), agregando el EDTA 55 minutos de iniciado el hervor, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de bloque, pero en la digestión donde se agregaron los ingredientes de FDN en polvo, la digestibilidad fue menor a 68.78% con diferencias significativas ($p < 0.05$) con el otro tratamiento de predigestión más solución FDN (17.12%) y con el de FDN modificado (72.07%) entre estos últimos no hubo diferencias.

En el Cuadro 16 que muestra resultados de predigestión de 1 gramo de sorgo en 0.25 ml de TK a 30 minutos mas ingredientes para FDN en polvo y en solución y otro tratamiento con solución FDN modificado (pH 7 sin EDTA), agregando el EDTA 55 minutos de iniciado el hervor. Donde se agregaron los ingredientes de FDN en polvo, la desaparición fue menor (68.78%) con diferencias significativas ($p < 0.05$) con el otro tratamiento de predigestión mas solución FDN (71.12%) y con el de FDN modificado (72.07%) entre estos últimos no hubo diferencias.

CUADRO 16.

Desaparición del grano de sorgo (1 g) con Solución Fibra Detergente Neutro modificado y con predigestión en agua a 30 minutos mas solución Fibra Detergente Neutro agregando el polvo o preparando la solución, usando 0.25 ml de TK.

Predigestión (30 min) + Polvo DN	Predigestión (30 min) + SDN normal	SDN (pH 7) EDTA (55 min) + EDTA 5 min.
68.72	68.96	71.98
69.84	72.64	72.57
67.95	69.88	73.22
68.39	71.90	71.05
69.20	70.45	70.93
68.58	72.87	72.68
Prom. 68.78 b	71.12 a	72.07 a

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 1.15

El cuadro 17, donde se compararon las dos técnicas de predigestión y modificadas no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la desaparición del sorgo por efecto de técnica empleada.

CUADRO 17.

Desaparición con Takatherm (0.25 ml) sobre sorgo molido (1 g) con solución Detergente Neutro modificada 55 minutos y con predigestión en H₂O por 30 minutos.

Desaparición (%)	
DN Modificada	Predigestión
72.67	75.96
72.64	75.45
72.67	73.70
72.64	76.62
76:55	75.87
75.91	76.11
Prom. 73.85 a	75.62 a

Literal diferente indica diferencias significativas ($p<0.05$).

C.V.: 2.17

Cuarta etapa.

En el análisis estadístico del primer ensayo (cuadro 18) no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) por efecto de las enzimas pero si por sustratos, donde entre sorgo y maíz no existen diferencias significativas ($p>0.05$) con promedios de 89.96% para sorgo y 90.22% para maíz, pero las hay ($p<0.05$) entre estos y el de almidón puro de maíz que tuvo 98.26% de digestibilidad.

CUADRO 18.

Desaparición de los granos de sorgo, maíz y almidón por efecto de Takatherm L-340® y A-3306® en la técnica modificada de FDN de Van Soest.

	Desaparición (%)			
	Sorgo (1 g)	Maíz (1 g)	Almidón (1 g)	Promedio
Takatherm L-340® (0.25 ml)	88.68	88.73	94.50	
	99.00	89.83	98.00	
	88.93	90.03	97.93	
	89.00	88.65	99.25	
	91.25	98.67	99.90	
	91.73	93.13	99.63	
Promedio	91.43	91.50	98.20	93.71 a
A- 3306 ® (0.25 ml)	89.30	90.38	98.83	
	90.25	91.35	100.00	
	90.05	88.18	99.25	
	89.18	90.13	99.45	
	92.15	87.15	96.48	
	80.18	86.35	95.88	
Promedio	88.52	88.92	98.33	91.92 a
Promedio	89.96 b	90.22 b	98.26 a	

0.25ml de Takatherm = 85,000 MWU (Unidades Modificadoras de Wohlgemuth).
 Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 3.42

El Cuadro 19 muestra la digestibilidad de los granos de sorgo, maíz y del almidón por efecto del método para fibra detergente neutro sin modificar y una previa digestión de 30 minutos en ebullición con agua y las enzimas Takatherm L-340® y A-3306®, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) por efecto enzima. Por efecto de sustrato no hubo

diferencias significativos ($p > 0.05$) entre sorgo (85.97%) y maíz (87.05) pero, si ($p < 0.05$) entre estos con el almidón (97.69%).

CUADRO 19.

Desaparición de los granos de sorgo, maíz y del almidón por efecto de la FDN y previa digestión con agua y con Takatherm L-340® y A-3306® por 30 minutos en ebullición.

	Digestibilidad (%).			
	Sorgo (1 g)	Maíz (1 g)	Almidón (1 g)	Promedio
Takatherm L-340® (0.25 ml)	82.38	86.68	98.00	
	84.48	80.00	91.28	
	84.83	87.63	96.83	
	85.95	87.48	97.60	
	99.55	90.15	98.90	
	87.13	89.10	99.87	
Prom.	87.38	86.84	96.02	90.44 a
A-3306® (0.25 ml)	87.50	87.68	95.93	
	79.48	81.73	98.20	
	84.30	86.78	98.48	
	80.50	85.85	98.63	
	88.70	90.70	99.90	
	86.85	90.85	98.63	
Prom.	84.55	87.27	98.30	90.04 a
Promedio	85.97 b	87.05 b	97.69 a	

0.25 de Takatherm = 85,000 MWU

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 4.36

El Cuadro 20 muestra los promedios de los cuadros 18 y 19 y se incluye para observar el efecto de la técnica empleada: SFDN con predigestión y la de solución detergente neutro

modificado. Se observa que por efecto enzima no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$), con una desaparición promedio de 90.07% para el Takatherm y 90.98% para la A-3306.

Por sustrato tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sorgo y maíz, con desaparición promedio de 87.97% y 88.63% respectivamente, pero sí ($p < 0.05$) entre estos con la del almidón con 97.97%.

CUADRO 20.

Promedios de desaparición en tres sustratos por efecto de las enzimas Takatherm L-340® A-3306® mediante las técnicas con Predigestión y Solución Detergente Neutro Modificada.

Desaparición Promedio (%)					
Enzima	Técnica	Sorgo	Maíz	Almidón	Promedio
Takatherm L-340® 0.25 ml Promedio	Predigestión + FDN FDN modificado	87.38	86.84	96.02	90.08 b
		91.43	91.50	98.20	93.71 a
		89.40 b	89.17 b	97.11 a	
A-3306® 0.25 ml Promedio	Predigestión + FDN FDN modificado	84.55	87.27	98.30	90.04 b
		88.52	88.00	98.33	91.62 a
		86.53 b	87.63 b	98.32 a	
Promedio		89.97	88.40	97.72	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

* C.V.: 3.93

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos técnicas usadas, siendo el promedio de 90.24% en la prueba con SFDN modificada y de 92.82% de desaparición promedio para la técnica con predigestión.

En el Cuadro 21 se reportan los resultados de los azúcares reductores del ensayo 1. Se incluyen los mililitros gastados para la titulación del líquido problema. Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de enzimas con 0.18 gramos para el Takatherm y 0.16

para A-3306. En el almidón hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con 0.21 g de azúcar reductor recuperado sobre el sorgo y maíz con 0.15 y 0.14 g respectivamente, entre los que no hubo diferencias significativas.

CUADRO 21.

Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de sustratos digeridos por la Solución de Detergente Neutro Modificado y enzimas Takatherm L-340® y A-3306®.

	Sorgo		Maíz		Almidón		Promedio
	g ¹	ml ²	g ¹	ml ²	g ¹	ml ²	
DN + TK 0.25 ml	0.12	30.1	0.14	25.9	0.27	18.1	
	0.12	30.6	0.13	27.5	0.27	18.4	
	0.14	25.0	0.13	26.4	0.20	17.4	
	0.15	23.8	0.17	20.6	0.20	17.4	
	0.14	25.5	0.15	23.2	0.26	19.0	
	0.17	21.0	0.15	23.7	0.27	18.7	
Promedio	0.14		0.14		0.25		0.18 a
DN + A3306 0.25 ml	0.13	26.0	0.14	25.1	0.17	20.6	
	0.15	22.6	0.11	31.7	0.16	21.7	
	0.15	23.8	0.14	25.0	0.27	18.8	
	0.15	23.0	0.13	27.5	0.20	17.7	
	0.15	22.0	0.15	24.0	0.17	21.7	
	0.23	15.0	0.13	27.2	0.15	22.5	
Promedio	0.16		0.13		0.19		0.16 a
Promedio	0.15 b		0.14b		0.21 a		

¹ gramos de azúcares reductores provenientes de los sustratos sorgo, maíz y almidón

² mililitros gastados para la titulación.

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 17.82.

En el Cuadro 22 del experimento dos se reportan los azúcares reductores recuperados mediante la prueba de Fehling. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de enzimas o sustratos.

CUADRO 22.

Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling del filtrado de sustratos digeridos por solución Detergente Neutro y Predigestión con Takatherm L-340® y A-3306®

Enzima	Sorgo		Almidón		Maíz		Promedio (g)
	(g)	(ml)	(g)	(ml)	(g)	(ml)	
Takatherm (0.25 ml)	0.10	50.2	0.13	37.0	0.17	29.0	
	0.10	50.0	0.13	37.0	0.17	28.5	
	0.20	24.0	0.21	24.0	0.28	18.0	
	0.19	26.0	0.21	24.0	0.26	19.0	
	0.14	24.0	0.13	25.0	0.15	21.5	
	0.13	26.0	0.12	27.0	0.17	19.5	
Promedio	0.14		0.15		0.20		0.17 a
A-3306 (0.25 ml)	0.14	35.0	0.14	35.5	0.16	30.0	
	0.13	37.0	0.14	35.0	0.17	29.5	
	0.22	23.0	0.20	25.0	0.22	23.5	
	0.24	20.5	0.19	26.0	0.28	18.5	
	0.15	22.0	0.14	24.5	0.17	19.0	
	0.14	23.0	0.14	24.5	0.16	20.0	
Promedio	0.17		0.16		0.19		0.17a
Promedio	0.16		0.16 a		0.20 a		

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 29.36

En el Cuadro 23 se muestran los promedios de los dos cuadros anteriores (técnicas con predigestión y fibra detergente neutro modificada). El análisis estadístico muestra resultados por efecto de la técnica usada. Solo se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de almidón (0.25 g) sobre el sorgo y maíz que tuvieron 0.15 g. El efecto de técnica y enzimas empleados no influyeron sobre los resultados con valores promedios de 0.17 g para todos los casos.

CUADRO 23.

Promedios de azúcares reductores (g) y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de substratos digeridos por solución FDN modificado y con predigestión con Takatherm y A-3306 (0.25 ml).

		Sorgo		Maíz		Almidón	
		g	ml	g	ml	g	ml
Takatherm (0.25 ml)	Predigestión	0.14	33.36	0.16	29.0	0.20	22.58
	DN Modificado	0.15	26.00	0.14	24.55	0.27	18.17
A-3306 (0.25 ml)	Predigestión	0.17	26.75	0.16	28.42	0.19	23.42
	DN Modificado	0.16	22.1	0.13	26.8	0.19	20.5

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 24.34

El Cuadro 24 muestra el residual de almidón en el líquido sobrenadante, donde hubo valores por debajo de 0.0064 g/l de almidón. No se le realizó análisis estadístico porque niveles no representan problema para la filtración, ni influirían en los análisis de FDN de forrajes con almidón.

CUADRO 24.

Lectura (nm) por fotocolorimetría y contenido de almidón (%) en el líquido sobrenadante de los tratamientos con almidón predigerido por Takatherm L-340® y A-3306® más solución Detergente Neutro.

Concentración de Almidón g/l						
Sustrato/Enzima	Sorgo		Maíz		Almidón	
	%	nm	%	nm	%	nm
Takatherm	00.57	0.062	00.53	0.058	00.036	0.004
	00.67	0.074	00.59	0.065	00.082	0.009
	00.57	0.062	00.31	0.034	00.009	0.001
	00.62	0.068	00.51	0.056	00.045	0.005
	00.55	0.061	00.32	0.035	00.018	0.002
	00.57	0.062	00.31	0.034	00.018	0.002
	A-3306	00.57	0.062	00.45	0.050	00.036
00.62		0.068	00.34	0.037	00.070	0.008
00.53		0.058	00.23	0.025	00.009	0.001
00.55		0.060	00.31	0.034	00.030	0.004
00.54		0.059	00.24	0.026	00.018	0.002
00.49		0.069	00.33	0.036	00.009	0.001

0.109 nm = 0.0001% de almidón sobrenadante.

Literal diferente indica diferencias significativas (p<0.05).

C.V.:

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La primera etapa experimental sirvió de base para descartar niveles de Takatherm no aptos para el fin buscado, y se encontró que niveles recomendados por el laboratorio (0.25 a 0.75 litros para 1000 kg. de almidón en base seca al 30% en solución) no fueron adecuados para emplearse en análisis de determinación de FDN.

De acuerdo a lo reportado por Fleche (1985), hubo una rápida reducción de la viscosidad de almidón cuando se probaron niveles más bajos de Takatherm (0.0075ml y 0.01ml) sobre tres niveles (bajo y alto) de almidón no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros en estudio, aunque los niveles de la enzima fueron por debajo del experimento anterior. En ambos casos, cuando se agregaron las gotas de lugol, presentaron cierta coloración azulosa que indicaban presencia de almidón, por lo que valores inferiores a 0.1 ml de Takatherm se consideraron no aceptables para usarse en las siguientes pruebas.

Se probó un nivel bajo de Takatherm (0.075) con uno alto (0.3) a diferentes niveles de almidón (0.1 a 1.1 g) sin encontrar diferencias significativas por enzima, pero sí con el nivel bajo de almidón (0.1 g) con 82.49 % de digestibilidad a diferencia de los demás que rebasaron el 92.00%. Esta significancia es un tanto extraña porque teóricamente, a menor cantidad de almidón la digestibilidad debería ser mayor, habiendo en el experimento un efecto contrario en todos los demás tratamientos aunque podría explicarse también porque a menor cantidad de sustrato el error experimental es mayor.

Al no encontrarse diferencias significativas entre 1.3 g de almidón o menos, se optó por usarse un gramo para las subsecuentes pruebas, siendo el máximo hipotético presentado en un análisis normal de fibra detergente neutro.

En la segunda etapa donde con un gramo de almidón a diferentes niveles de Takatherm en 15 minutos no se encontraron diferencias en ningún parámetro de estudio y los valores

de digestibilidad promedio por efecto de enzima estuvieron arriba de 91.5 % en este caso se incluyo también 0.075 ml de Takatherm como prueba testigo porque niveles menores presentaron coloración azulosa, aún cuando la digestibilidad fue buena. No se determino el punto intermedio entre 0.075 y 0.1 ml de Takatherm capaz de disolver el almidón en los tiempos estudiados. A partir 0.1 ml no se presentó coloración azulosa.

También se hicieron pruebas con 15 y 30 minutos, variando niveles de Takatherm en un gramo de almidón con digestibilidades en todos los casos por arriba de 92% sin diferencias significativas para ninguna variable; lo que indicó que es indistinto usar tiempos de 15 a 30 minutos. A partir de 0.5 ml de Takatherm aparecían partículas blanquecinas parecidas a leche cortada suspendidas en el sobrenadante reposado y pegadas en la pared del tubo, se atribuyo a la enzima desnaturalizada (no comprobada) porque era proporcional al nivel de la misma y en pruebas efectuadas con agua sin almidón se observó el mismo fenómeno, decidiéndose usar niveles que estuvieran entre 0.1 a 0.5 ml.

En pequeñas pruebas previas se había observado que la digestión se efectuaba, adicionando la enzima una vez iniciada la ebullición, poco antes de los 5 minutos. Se hizo una prueba para demostrarlo pero en los valores obtenidos, el tiempo a 15 minutos tuvo diferencias significativas con digestibilidades arriba del 92% a diferencia de los otros tiempos (5, 10 y 30 min), donde el valor máximo fue de 88.9% a 86.4% para el primero y el segundo respectivamente y de 87.4% para el de 30 minutos. No queda claro porque el tiempo a 15 minutos tuvo mayor porcentaje de digestibilidad que el de 30 minutos.

Con niveles de 0.1 a 0.5 ml de Takatherm y 0.2 a 1 g de almidón la digestibilidad en agua por 30 minutos no mostró diferencias significativas en ningún caso, aunque los promedios por efecto de enzima y de almidón se encuentran entre 82 a 87% por debajo de anteriores pruebas donde fue superior a 90%.

En la tercera etapa donde se sustituyó el agua por solución de FDN se emplearon 0.25 ml de Takatherm y diferentes niveles de almidón y tiempos de adición del EDTA después de iniciada la ebullición.

En coincidencia con Franco *et al* (1987), el efecto por pH ácido sobre la digestibilidad del almidón se mostró detrimental sobre la actividad enzimática del Takatherm, pues se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a favor del pH neutro, indicándose la conveniencia de neutralizar las soluciones usadas para alcanzar la eficiencia enzimática (las indicaciones del laboratorio son entre un pH de 6 a 7). El tratamiento con agua (mas calcio 200 ppm), enzima y sin almidón, tuvo como objeto probar que el residual enzimático en el filtro sería de poca importancia sin alterar los resultados del análisis FDN; esto se comprobó, pues el residuo promedio retenido fue de 0.014 que en una FDN tendría poco efecto en su valor numérico. Se usó 0.25 ml de Takatherm y en las pruebas prácticas se recomienda de 0.1 a 0.3 ml.

En la prueba en la que se hizo predigestión de un gramo de almidón con Takatherm y agua, previa a la acción de solución de fibra detergente neutro sin modificar, se observó que sin predigestión (tiempo 0) hubo baja digestibilidad del almidón, datos que no concuerdan con los encontrados por Plata y Col.(1992). Con una predigestión, de 15 minutos la digestibilidad no muestra diferencias con los de mayor tiempo. Lo anterior indica la necesidad de hacer predigestión mayor a 15 minutos si se utiliza solución de fibra detergente neutro normal o modificar la solución detergente neutro, ajustando el pH a 7 y agregando el E.D.T.A. entre 30 a 55 minutos de iniciado el hervor hasta completar la hora.

Las pruebas que se hicieron para comprobar la eficiencia de las dos técnicas: predigestión y solución con FDN modificada, no encontrándose diferencias entre ellas usando sorgo y 0.25 ml de Takatherm. Se demostró también que al agregar polvo FDN en lugar de solución cuando se hace predigestión, se tienen digestibilidades más bajas que cuando se agrega solución. No se explica ese efecto, ya que al agregar el polvo se disolvió

bien en el agua y no se alteraba el volumen (100 ml) de la prueba de Van Soest al no incluir más agua de la necesaria.

En la prueba con las dos técnicas: predigestión y solución FDN usando sorgo finamente molido y 0.25 ml de Takatherm no muestran tampoco diferencias, por lo que se toma también como base para usarse las dos técnicas en las pruebas finales con las dos enzimas Takatherm y A-3306.

Por cuestiones técnicas y económicas, no se hicieron más pruebas comparativas con el A-3306 donde las primeras a las últimas etapas del trabajo.

La cuarta etapa del trabajo se considera la más importante por ser concluyente del objetivo de estudio. Para ambas técnicas: con predigestión y con solución FDN modificado, solo se encuentran diferencias significativas efecto de sustrato, con la desaparición mas alta en el almidón puro que en el sorgo y maíz , en donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estas últimas, éstos datos coinciden con Mendoza (1991), Cone *et al* (1989), Malestein *et al*(1988), que mencionan diferencias en la degradabilidad del almidón por efecto de la fuente de origen forma y tratamiento a que sea sometido(25,29). Así se observa que la digestibilidad fué mayor en el almidón puro de maíz, después en el maíz y por último en el sorgo.

El aspecto mas importante es que no se encontraron diferencias estadísticas entre ambas enzimas por efecto de ellas o de técnica empleada, con valor para el Takathem de 90.07% promedio de desaparición y para la A-3306 fue de 90.98%, numéricamente superior con 0.91% a favor de la última, ésto coincide con Franco *et al* (1987) que no encontraron diferencias en la desaparición del almidón del mismo tipo al tratarlo con diferentes alfa-amilasas bajo las mismas condiciones (13).

Se observó que en el momento de la digestión había un efecto de desaparición ligeramente más marcado de la enzima A-3306, terminando la digestión 2 a 3 minutos antes que el TK.

Por efecto de la técnica empleada existen diferencias estadísticas a favor de la solución Detergente Neutro Modificada. Estas diferencias no excluyen el uso del Takatherm como sustituto de la A-3306, porque usando la solución Detergente Modificada se cumple el objetivo de realizar la prueba en el mismo tiempo y resultados, pero a menor costo que en la técnica de Van Soest (1991), habiendo el inconveniente de preparar una solución sin EDTA y ajustarla a pH neutro, además de agregar el EDTA en polvo a los 55 minutos de iniciado el hervor, pasos que no son necesarios en la técnica propuesta por Van Soest. El uso de la predigestión evitaría esos pasos pero agregaría el de los 30 minutos de predigestión.

En pruebas anteriores se demostró que niveles de 0.5 ml de Takatherm en lugar de 0.25 ml y no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las dos técnicas; habría que hacer más comparaciones entre las dos enzimas con niveles de Takatherm superiores a 0.25ml.

El uso de niveles más altos del Takatherm se justifica por su bajo costo; actualmente 10ml de la enzima A-3306 cuesta N\$ 400.00 (USA\$ 66,66), mientras que un litro de Takatherm L-340 es de N\$ 70.00 (USA\$ 11.67). Debe mencionarse que en la técnica de Van Soest (1991) se recomienda utilizar 0.1 mililitro de A-3306 y que en el presente trabajo se usó 0.25ml, 2.5 veces más de lo recomendado, lo que no invalida el uso del Takatherm por las razones mencionadas (ver apéndice II).

Aún con el inconveniente encontrado en la técnica empleada por Plata y Col. (1992), las conclusiones del presente trabajo coinciden con las de aquellos en que el Takatherm puede emplearse satisfactoriamente en el técnica de Fibra Detergente Neutro de Van Soest (1991)

en alimentos fibrosos ricos en almidón, digiriendo éste y permitiendo la adecuada filtración, evitando la sobrestimación de la fibra detergente neutro en dichos alimentos.

En los valores de azúcares reductores no se obtuvieron resultados esperados, del gramo de almidón que se sometió a digestión enzimática, el valor máximo recuperado como azúcares fue de 0.18 g con promedios entre 0.16 a 0.21 g, lo que sugiere y de acuerdo con autores como Reilly *et al* (1985), que las enzimas, tanto de Takatherm como de A-3306 no degradan el almidón hasta mono o disácaridos, dejándolos en un estado intermedio, permitiendo, aún así el filtrado sin alterar los resultados, porque esas moléculas no se quedan retenidas en el filtro.

Las pruebas con espectrofotometría para detectar almidón en el líquido sobrenadante arrojó resultados muy bajos que no interfieren en los resultados de la técnica fibra detergente neutro ni en la facilidad para la filtración. Los valores, aunque bajos, tuvieron tendencia a ser mayores en el sorgo, maíz y finalmente almidón, pero esas diferencias pudieran deberse a la presencia de otros compuestos no glúcidos como pigmentos, porque las soluciones de sorgo y maíz eran de tonalidad más amarillenta (no turbia), que aquellas con almidón donde era transparente. En ningún caso presentaron tonalidades azulosas que indicaran presencia de almidón.

En conclusión, la alfa amilasa Takatherm L-340 puede sustituir satisfactoriamente a la alfa-amilasa A-3306 en la técnica de Van Soest modificada (ver apéndice II) para determinar Fibra Detergente Neutro en alimentos con alto contenido de almidón, usando entre 0.1 a 0.5 ml de enzima por gramo de muestra.

Lieratura Citada.

- 1) Alba J. De.: Alimentación del Ganado en America Latina. 2a. Ed., Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1971.
- 2) Alanís R., J. A.: Efecto de la Suplementación nitrogenada y energética en las tasas de fermentación de ingredientes lignocelulósicos. Tesis de Maestría, Centro de Ganadería del Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo. de México 1989.
- 3) Bhagavan, N. V.: Bioquímica. 3a. ed., Ed. Interamericana, México, 1978.
- 4) Beauchemin, R. A.: Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and alfalfa hay quality on chewing, rumen function and milk production. *J. Dairy Sci.*, 74: 3140-3151 (1991).
- 5) Cone J., W.; Zline-theil, W.; Malestein, A. and Klodster, A. Th.: Degradation of starch by incubation with rumen fluid. A comparavision of different starch sources. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 173-183 (1989).
- 6) Church, D. C.: Livestock Feeds and Feeding 3rd. Ed. Prentice Hall; New Jersey, 1991.
- 7) Church, D. C. and Pond, W. G.: Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 3a ed. Limusa, México, 1988.
- 8) Coughlan P., M.: Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. *Anim. Feed Sci. & Technol.*, 32: 77-100 (1991).
- 9) De Boever J., L.; Gottyn B., G.; Andries J., J; Buysse F., A and Banacker J., M.: The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable net energy of forages. *Anim. Feed Sci. & Technol.*, 19: 247-260 (1988).
- 10) Dehority B. A.: Effects of microbial synergism on fiber digestion in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.*, 50: 149-159 (1991).
- 11) Fleche, G.: Chemical modification and degradation of starch. *Starch conversion technology*. Marcel Dekker Inc. , N. Y., 1985.
- 12) Fox D. G.; Sniffen C. J.; O'Connor J. D.; Russell J. B. and Van Soest P., J.: A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirement a diet adequacy. *J. Anim. Sci.*, 70: 3578-3596 (1992)

- 13) Franco, C. M. L.: Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. *Starch/storke* Nr. 12. S. 39: 432-435, 1987.
- 14) Glennie, C. W.: Physico-chemical properties of sorghum starch thermally treated by different methods. *Starch/storke*, Nr. 8. S. 39:237-276, (1987).
- 15) Goering H. K. and Van Soest P. J: Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric. Handbook No. 379* ARS-USDA, Washington, D.C., 1970
- 16) Gravert, H. O.: Dairy-Cattle Production. *Elsevier Sci. Publ. B. V.*, New York. 1987.
- 17) Herrera H. J., Lorenzana C. G.: Aplicaciones del SAS (Statistical Analysis System) a los Métodos Estadísticos. *Inst. Téc. Agropecuario de Oaxaca No. 23*, México, 1994.
- 18) Hodgson, J.: Grazing Management, Sci. into Practice. *Longman Scientific & Technical*; England, 1990.
- 19) Hoover, W. H. and Stokes, S. R.: Balancing carbohydrates and protins for optimum Rumen Microbial Yield. *J. Dairy Sci.*, 74: 3630-3644 (1991)
- 20) Jeraci, J. L., Hernández, T., Roberson J. B. and Van Soest, P. T.: (Abst. J. An. Sci.) New and improved procedure for neutral-detergent fiber. *Cornel University, Ithaca, N. Y.*, (1991).
- 21) Jones, C. A.: C4 Grasses and Cereals, Growth, Development, and Stress Response. *John Wiley & Sons*, N. Y., 1988.
- 22) Lee, Ping C.; Brooks, S. P.; Kim, O.K.; Hertlinger, L. A. and Lebenthal, E.: Digestibility of native and modified starches: In vitro studies with human and rabbit pancreatic amilases and in vivo studies in rabbits. *J. Nutr.* 115:93-103, (1985).
- 23) Lehninger, A. L.: Bioquímica, 2a. Ed. *Omega S.A.*, Barcelona, 1985.
- 24) López M. C. A, y Quintero R. R.: Tecnología Enzimática (aplicaciones en alimentos y medicina). *Coordinación de la Investigación Científica, Programa Universitario de Alimentos*, U.N.A.M., México, 1987.
- 25) Malestein, A.; Klooster A. Th and Cone J. W.: Degradability of various types of starch by incubation with rumen fluid or with bacterial alfa-amilasa. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 59:225-232, (1988).

- 26) Mathers J. C.; Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. *Proc. Nutr. Soc.*, 50: 161-172 (1991).
- 27) Maynard L. A., Loosli J. K., Hintz H. F., Warner R., G.: *Nutrición Animal*, 9a. Ed. Mc. Graw-Hill, México, 1992.
- 28) Mendenhall, W.: *Introducción a la Probabilidad Estadística*, 5a. Edición Wadsworth Inc. USA., 1982.
- 29) Mendoza M. G. y Ricalde V. R.: *Alimentación del Ganado Bovino con Dietas Altas en Granos*. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México, 1993.
- 30) Mendoza M., G. D. y Britton R., A. and Stock, R. S.: Effect of protozoa and urea level on *in vitro* starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *EL SERVIER, Anim. Feed Sci and Tec.* 54:315-325, USA (1994).
- 31) Monties B.: Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. & Technol.*, 32: 159-175 (1991).
- 32) Moore J. E. and Mott G. O.: Fermentation tubes for *in vitro* digestion of forages. *J. Dairy Sci.*, 59:1, 167-169 (1975).
- 33) Nefzaoui A. and Vanbelle M.: Selection of Appropriate Methods for "in vitro" and Agro Industrial by Products in Developing Countries. Better Utilization of Crop Residues and By-products in Animal Feeding Research Guidelines. 1 State of Knowledge. Preston, T. R., Kossila V. Godwin J. Reed, S. B (Eds), *FAO Animal Production and Health paper 50*, 1986.
- 34) Nocek J E. and Tamminga, S.: Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3598-3629, (1991).
- 35) *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press, Washington, D. C., 1989.
- 36) Orskov, E. R.: *Feeds and Animal Nutrition*. Elsevier Sci. Publ., Co. Inc., N. Y., 1988.
- 37) Owens Owens, F. N.; Zinn, R. A. and Kim Y., K.: Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.*, 63:1634-1648 (1986).%
- 38) Plata P. F., Mendoza M. G., Bárcena G. R, González M. S.: Efecto del cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la digestión de fibra de paja de avena en

dietas para vaquillas. Tesis de Maestría. *Colegio de Posgraduados, Centro de Ganadería Montecillo, México*, 1992.

- 39) Poore M. H., Moore J. A., Swingle R. S., Eck T. P.; and Brown, W. H.: Wheat straw or alfalfa hay in diets with 30 % neutral detergent fiber for lactating holstein cow. *J. Dairy Sci.*, 74: 3152-3159, (1991).
- 40) Poore M. H., Moore, J. A., Swingle R. S., Eck T. P. and Brown W. H.: Response of lactating holstein cows to diets varying in fiber source and ruminal starch degradability., *J. Dairy Sci.*, 76: 2235-2243, (1993).
- 41) Reilly, P. J.: Enzimic degradation of starch. Starch Conversion Technology. *Marcel Dekker Inc.* N.Y., 1985.
- 42) Riis P. M.: Dynamic Biochemistry of Animal Production. *Elsevier Sci. Publ. Co. Inc.*, N. Y., 1983.
- 43) Russell J. B.; O'Connor J. D.; Fox D. G.; Van Soest P. J. and Sniffen C. J.: A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets; I. ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 70: 3551-3561 (1992).
- 44) Sniffen C. J.; O'Connor J. D.; Van Soest P. J; Fox D. G. and Russell J. B.: A Net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.*, 70: 3562-3577 (1992).
- 45) Stelmock R. L.; Husby F. M. and Brundage A. L.: Application of Van Soest acid detergent fiber method for analysis of shellfish chitin. *J. Dairy Sci.* 68: 1502-1506. (1985).
- 46) Swinkels, J: J. M.: Sources of starch, its chemistry and physics starch conversion technology. *Marcel Dekker, Inc.* N. Y. 1985.
- 47) Taithfull N. T.: The in vitro digestibility of feeds -stuffs- a century of ferment. *J. Sci. Food Agric.*, 35: 819-826, (1984).
- 48) Tilley M. A. and Terry R. A.: A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forrage crops. *J. Brit. Grass. Soc.*, 18: 104-111. (1963).
- 49) Tejada I. de H.: Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales. *Sistema de Educación Continua en Prod. Anim., A.C.*, México, 1992.

- 50) Valdivia L. M. A.: Análisis Físicoquímico de Alimentos. Curso Teórico Practico (Memorias). *Coord de la Inv. Científica, Programa Universitario de Alimentos.* U.N.A.M., México, 1994.
- 51) Van Soest P. J.: Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.*, 26: 119-128, (1967).
- 52) Van Soest P. J., and Mc Queen R. W.: The chemistry and estimation of fibre. Symposium on fibre in human Nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, 32; 123 (1973).
- 53) Van Soest P. J.: Nutritional Ecology of the Ruminant. *O & B Book Inc.*; U.S.A., 1982.
- 54) Van Soest P. J.; Robertson J. B. and Lewis B. A.: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597 (1991).
- 55) Waldern D. E.: A rapid micro-digestion procedure for neutral and acid detergent fiber. *Can. J. Anim. Sci.*, 51: 67-69., april 1971.
- 56) Wester T. T.: Evaluation of starch and protein of grain sorghum hybrids for finishing ruminants. Master of Sciencce Thesis., *University of Nebraska*, Lincoln, N. E., 1989.

I. Apéndice de cuadros

CUADRO 8A.

Análisis estadístico

Desaparición del almidón (1 g) con Takatherm (0.25 ml) a pH neutro y ácido en agua a 30 minutos.

	Desaparición Promedio (%)				
Bloque	1	2		n	Núm.
pH	96.84	96.43		9	2
	TK solo 99.86a	TK + Al pH7 97.02b	TK +Al pH 5.8 93.02c	6	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 1.31

CUADRO 9A.

Análisis Estadístico.

Efecto de dos niveles de Takatherm L-340® sobre la desaparición en tres niveles de almidón a 15 minutos de ebullición en agua.

Bloque	Desaparición promedio (%)			n	Num.
	1	2			
Enzima (ml)	84.92a	87.95a		18	2
	0.0075 86.60a	0.01ml 86.26a			
Almidón (g)	0.1	0.7	1.3	12	3
	82.24a	90.89a	86.17a		

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 10.05

CUADRO 10A.

Análisis Estadístico.

Dedaparición de diferentes niveles de almidón con dos de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua.

	Desaparición Promedio (%)							n	No.
Takatherm (ml)	0.3	0.075							
	92.69 ^a	92.43 ^a						36	2
Almidón (g)	0.1 82.49 ^b	0.3 92.09 ^a	0.5 93.53 ^a	0.7 95.58 ^a	0.9 95.70 ^a	1.1 95.96 ^a	12	6	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 3.48

CUADRO 11A.

Análisis Estadístico.

Desaparición de 1 gramo de almidón por efecto de diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 minutos de ebullición en agua.

	Desaparición promedio (%)											n	No
Bloque	1	2										30	2
Tk (ml)	91.99 ^b 92.08a	93.05 ^d 92.21a	0.3 91.46a	0.5 93.49a	0.7 92.73a	0.9 93.97a	1.1 91.42a	1.3 92.31a	1.5 92.79a	1.6 92.77a		6	10

Literal diferente indica diferencia estadística (p<0.05).

C.V.: 1.77

CUADRO 12A.

Análisis Estadístico.

Desaparición de 1 gramo de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 15 y 30 minutos de ebullición con agua.

Desaparición promedio (%)								
Bloque	1	2					n	Num
Tiempo (min)	92.77 ^a	92.76 ^a					36	2
	15	30						
Takatherm (ml)	92.81 ^a	92.72 ^a					36	2
	0.075	0.1	0.5	0.9	1.3	1.6	12	6
	92.96a	92.69a	93.53a	92.73a	92.33a	92.36a		

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 2.89

CUADRO 13 A.

Análisis estadístico .

Desaparición de 1 g de almidón a 3 niveles de Takatherm L-340® y a 4 tiempos de ebullición en agua.

Bloque	Desaparición Promedio (%)					n	No.
	1	2					
	88.23a	88.52a				2	36
Takatherm (ml)	0.1	0.3	0.5			3	24
	88.76a	87.90a	88.56a				
Tiempo (min)	5	10	15	30			
	86.89b	86.39b	92.86a	87.36b		4	18

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 3.72

CUADRO 14A.

Análisis Estadístico.

Desaparición de diferentes niveles de almidón con diferentes niveles de Takatherm L-340® a 30 minutos de ebullición en agua.

Bloque	Desaparición promedio (%)					n	Num.
	1	2					
Almidón (g)	83.90 a	85.44 a				30	5
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0		
Takatherm (ml)	83.23 a	82.36 a	87.79 a	85.33a	84.63 a	30	5
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5		
	85.28a	81.93 a	83.79 a	87.22a	85.10 a		

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 9.79

CUADRO 15A.

Análisis Estadístico.

Desaparición de 1 g de almidón en solución de Fibra Detergente Neutro con predigestión con 0.25ml de Takatherm L-340® a diferentes tiempos de ebullición en agua.

	Desaparición Promedio (%)								
Bloque	1	2					n	No.	
	68.20a	68.85a					18	2	
Tiempo (min)	0	10	15	20	25	30			
	32.12c	47.97b	79.05a	80.66a	84.02a	87.35a	6	6	

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 12.70

CUADRO 16A.

Análisis Estadístico.

Desaparición del grano de sorgo (1 g) con Solución Fibra Detergente Neutro modificado y con predigestión en agua a 30 minutos mas solución Fibra Detergente Neutro agregando el polvo o preparando la solución, usando 0.25 ml de TK.

Desaparición Promedio (%)						
Bloque	1		2		n	Núm
	70.14		71.17		9	2
Técnica	DN normal (polvo) 68.78b	DN normal (solución) 71.12a	DN modificado. 72.07a		6	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 1.15

CUADRO 17A.

Análisis estadístico

Efecto de Takatherm (0.25 ml) sobre sorgo molido (1 g) con solución Detergente Neutro modificada 55 minutos y con predigestión en H₂O por 30 minutos.

	Desaparición promedio (%)			
Bloque	1	2	n	Num.
	74.57a	74.90a	6	2
Técnica	DN modificado 73.85a	Predigestión 75.62a	6	2

Literal diferente indica diferencias significativas (p<0.05)

C.V.: 2.17

CUADRO 18A.

Análisis estadístico.

Desaparición de los granos de sorgo, maíz y almidón por efecto de Takatherm L-340® y A-3306® en la técnica modificada de FDN de Van Soest.

Bloque	Desaparición promedio (%).				n	No.
	1	2				
Enzima (0.25 ml)	92.89a	92.83a			18	2
	Takaterm L340®	A-3306 ®			2	
	93.71A	91.92A			12	2
Sustrato 1 g	Sorgo	Maíz	Almidón			
	89.96b	90.22b	98.26a		12	3

Literal diferente indica diferencias significativas (p<0.05)

C.V.: 3.42

CUADRO 19A.

Análisis estadístico.

Desaparición de los granos de sorgo, maíz y del almidón por efecto de la FDN y previa digestión con agua y con Takatherm L-340® y A-3306® por 30 minutos en ebullición.

Desaparición promedio (%).					
Bloque	1	2		n	Num.
Enzima (0.25ml)	91.38a	89.09a		18	2
	Takatherm 90.44a	A-3306 90.04a		18	2
Sustrato (1g)	Sorgo 85.97b	Maiz 87.05b	Almidón 97.69a	12	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 4.36

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 21A.

Análisis estadístico.

Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de sustratos digeridos por la Solución de Detergente Neutro Modificado y enzimas Takatherm L-340® y A-3306®.

Bloque	Azúcares reductores (g)			n	Num.
	1	2			
Enzima (0.25 ml)	0.17 ^a	0.17 ^a		18	2
	Takatherm	A-3306			
Sustrato (1g)	0.18 ^a	0.16 ^a		18	2
	Sorgo	Maíz	Almidón		
	0.15 ^b	0.14 ^b	0.21 ^a	12	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 17.82

CUADRO 22A.

Análisis estadístico.

Determinación de azúcares reductores y mililitros gastados por el método de Fehling del filtrado de sustratos digeridos por solución Detergente Neutro y Predigestión con Takatherm L-340® y A-3306®

Bloque	Azúcares reductores (g)			n	Núm.
	1	2			
Enzima (0.25 ml)	0.17 ^a	0.17 ^a		18	2
	Takatherm 0.17 ^a	A-3306 0.17 ^a		18	2
Sustrato (1 g)	Sorgo 0.16 ^a	Maíz 0.16 ^a	Almidón 0.20 ^a	12	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 29.36

CUADRO 23A.

Análisis estadístico.

Promedios de azúcares reductores (g) y mililitros gastados por el método de Fehling en el filtrado de sustratos digeridos por solución FDN modificado y con predigestión con Takatherm y A-3306 (0.25 ml).

Bloque	Azúcares reductores (g)			n	Num.
	1	2			
	0.17	0.17		36	2
Enzima (ml)	Takatherm 0.17	A-3306 0.17		36	2
Técnica	DN Modificado 0.17	Predigestión 0.17		36	2
Sustrato	Sorgo 0.15	Maíz 0.15	Almidón 0.21	24	3

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 24.34

CUADRO 24A.

Análisis estadístico

Lectura (nm) por fotolorimetría y contenido de almidón (%) en el líquido sobrenadante de los tratamientos con almidón predigerido por Takatherm L-340® y A-3306® más solución Detergente Neutro.

Bloque	1	2		n	Num.
Cereal	0.000037 b	0.000048 a		18	2
	Sorgo	Maíz	Almidón		
Enzima	0.000058 a	0.000037 b	0.000031 b	12	3
	Takatherm L-340	A-3306		18	2
	0.000045	0.000039 a			

Literal diferente indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

C.V.: 37.21

II. Apéndice de Resultados

1. **Modificaciones a la técnica recomendada por Van Soest (1991):**

a) **Preparación de Soluciones:** Solución detergente neutra modificada:

- b) En 900 ml de agua destilada agregar: 30 g de dodecil sulfato de sodio U.S.; 8.18 g de borato de sodio $10 \text{ H}_2\text{O}$; 4.56 g de fosfato disódico anhidro y 10 ml de etilén glicol. Calentar para disolver y enfriar al medio ambiente.
- c) Ajustar a pH 7 empleando soluciones de NaOH al 2 o 3 % y si es necesario soluciones diluidas de un ácido fuerte.
- d) Llevar la preparación a 1000 ml.

Procedimiento.

- a) Depositar en un vaso de berzelius de 600 ml 1 g de muestra seca y molida.
- b) Adicionar en el siguiente orden: 100 ml de solución detergente neutro modificada y 0.25 ml de Takatherm L-340.
- c) Colocar el vaso berzelius con el contenido en la parrilla del digestor previamente calentada.
- d) Cuando la solución empiece a hervir, tomar el tiempo y reducir la temperatura para que la ebullición sea suave. A los 50-55 minutos adicionar 1.861 g de ácido etilén diamino tetracetato sódico $2 \text{ H}_2\text{O}$, agitar suavemente para disolverlo y competir el hervor hasta 60 minutos.
- e) En un crisol de vidrio (o papel filtro whatman # 5) previamente seco y a peso constante filtrar al vacío.
- f) Lavar bien con agua caliente (en ebullición).
- g) Lavar con acetona dos veces.
- h) Secar a 100-105 C por 12 o 24 horas para el crisol y 3 a 4 horas si es papel filtro.
- i) Enfriar en desecador y pesar.
- j) **Calculos:** $\% \text{ de Paredes Celulares} = \frac{\text{gramos de Paredes Celulares}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$

$$\% \text{ Contenido Celular} = 100 - \% \text{ de Paredes Celulares}$$