



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**VALOR NUTRICIONAL DE GRANOS DE SORGO ENSILADOS Y
RECONSTITUIDOS PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS**

Sebastián Brambillasca Alza

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2020**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**VALOR NUTRICIONAL DE GRANOS DE SORGO ENSILADOS Y
RECONSTITUIDOS PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS**

Sebastián Brambillasca Alza

Cecilia Cajarville, PhD

Directora de Tesis

José Luis Repetto, PhD

Co-Director de Tesis

**URUGUAY
2020**

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Rosa María Carabaño Luengo, Ing. Agr., PhD.

Universidad Politécnica de Madrid; Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas; Departamento Producción Animal; España.

Diovani Paiano, Ing. Zoot., MsC., PhD.

Universidad del Estado de Santa Catarina; Centro de Educación Superior del Oeste; Brasil.

Josep Gasà Gasó, Lic. Veterinaria, PhD.

Universidad Autónoma de Barcelona; Facultad de Veterinaria; Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos; España.



**Unidad de Posgrados
-Oficina de Posgrados-**

**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“VALOR NUTRICIONAL DE GRANOS DE SORGO ENSILADOS Y
RECONSTITUIDOS PARA LA ALIMENTACIÓN DE CERDOS”**

Por: Magíster Sebastián Brambillasca

**Directora de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville
Codirector de Tesis: Dr. José Luis Repetto**

Tribunal

Presidente: Dra. Rosa Carabaño

Segundo Miembro: Dr. Diovani Paiano

Tercer Miembro: Dr. Josep Gasa

Fallo del Tribunal: SSS- 12

JOSE GASAS Firmado
GASO - DNI digitalmente por
78064072 JOSE GASAS GASO
W - DNI 78064072W
Fecha: 2020.12.16
18:34:00 +01'00'

Montevideo, 16 de diciembre de 2020

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

Agradecimientos

En este apartado quisiera saludar y agradecer a las personas que me han acompañado en este trayecto.

Quiero agradecer a Natalia por haber tenido que llevar la difícil tarea de convivir conmigo y con esta tesis. Su paciencia infinita y apoyo son invaluable. ¡Muchas gracias, amor! Y a Mauro, que todavía no está con nosotros pero que está llegando, y a quien esperamos con impaciencia y amor.

A Marina Fernández y Nadia Wasem, dos compañeras con las que he compartido un montón de horas en esta travesía y de quienes he aprendido un montón. A Chema Arroyo por estar siempre, a su modo. ¡Muchas gracias!

A Cecilia y Joselo, por la capacidad que han tenido a lo largo de estos años de generar condiciones para que se desarrollen capacidades y se consolide un grupo humano en el IPAV - FVET que intenta todos los días plantearse desafíos mayores.

A mis compañeros del IPAV, Analía Pérez, Alsiane Capelesso, Ale Britos, Caro Fiol, Alvaro Santana, Gonzalo Fernández, Edu Morales, Germán Antúnez, Juan Dayuto, Nicolás Amaro, Mica García, Gabi Casarotto, Amayri Alvarado, Jeny Madera, por todas las horas compartidas juntos. A Carina Casini y Gabriel López por su colaboración diaria en lo logístico, y también por su amistad y cariño.

A Roberto Bauzá, con quién tuve la suerte de poder compartir el inicio de este proyecto, y a Martín Aguerre y Carmen García y Santos, con quienes lo fui continuando. A los compañeros de FVET Fernando Fumagalli, Danilo Fila, Ariel Aldrovandi, Cristina López, a Javier Díaz de INAC, a Javier Ithurralde, a Julio Mieres y a Lito, y a Luján Bentancur de la CNFR por su colaboración en distintas etapas de este proyecto.

A los amigos de la ETSIAAB de Madrid, Javier García, Rosa Carabaño, Nuria Nicodemus, Carlos de Blas, María Jesús Villamide, Carlos Rodríguez y Charo, Cesar Ocasio-Vega, Javi Herrero, Carlos Farías, Rebeca Delgado, Andrés Haro.

A la Lic. Adriana Haro, mi psicóloga, que también ha tenido que ver (¡y mucho!) en que haya podido llegar hasta aquí.

A la Facultad de Veterinaria de la UdelaR.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el apoyo económico (FMV_1_2017_1_136157).

A Natalia y Mauro

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	2
2.1. Producción y consumo de cereales a nivel mundial y nacional.....	2
2.2. Principales características del grano de sorgo.....	4
2.3. Particularidades del almidón en el sorgo.....	6
2.4. Factores del sorgo que limitan el uso de nutrientes.....	7
2.4.1. Kafirinas.....	7
2.4.2. Compuestos fenólicos.....	9
2.4.3. Fitatos.....	11
2.5. Procesamiento del grano de sorgo.....	11
2.6. Consideraciones adicionales sobre la reconstitución y ensilaje de granos de sorgo para cerdos.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
5.1. Experimento 1.....	17
5.2. Experimento 2.....	27
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	45
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	55
8. IMPLICANCIAS.....	55
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9. ANEXOS.....	68

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición química (g/kg MS) y contenido de amilosa (g/100 g de almidón) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituidos y ensilados durante 21 d como grano entero (RGE) o molido (RGM).....	22
Cuadro 2. Coeficiente de digestión <i>in vitro</i> del almidón a 240 min de incubación (D _{Ct240}), fracciones de almidón, índice de hidrólisis (HI) e índice glicémico predicho (IG _p) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituido y ensilado durante 21 días como granos enteros (RGE) o molidos (RGM).....	24
Cuadro 3. Parámetros de digestión y fermentación <i>in vitro</i> de la MS de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituido y ensilado durante 21 días como granos enteros (RGE) o molidos (RGM).....	25
Cuadro 4. Correlación entre parámetros de composición química (g/kg MS) y de digestión <i>in vitro</i> , y contenido de taninos condensados de los granos de sorgo.....	26
Cuadro 5. Ingredientes y composición química de dietas experimentales.....	29
Cuadro 6. Composición química, contenido de amilosa, pH, fracciones de almidón, índice de hidrólisis, índice predicho de glicemia y digestibilidad <i>in vitro</i> del almidón de granos de sorgo secos, reconstituidos y ensilados.....	36
Cuadro 7. Fracciones de almidón (g/kg MS), índice de hidrólisis (IH), índice glicémico predicho (IG _p) y coeficiente de digestión <i>in vitro</i> del almidón (CD _t) a los 240 y 480 min de incubación de las dietas experimentales.....	37
Cuadro 8. Consumo de alimento, digestibilidad aparente de nutrientes en el tracto total y digestibilidad ileal aparente del almidón en lechones alimentados con las dietas experimentales.....	39
Cuadro 9. Consumo, excreción y retención de N en lechones alimentados con las dietas experimentales.....	40
Cuadro 10. Características fecales, y pH en digesta y heces en lechones alimentados con las dietas experimentales.....	41
Cuadro 11. Digestión <i>in vitro</i> de la MO y parámetros de fermentación de las dietas experimentales incubadas con heces de los lechones alimentados con las mismas dietas.....	42
Cuadro 12. Producción de lactato, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) y proporciones molares (%) de acetato, propionato y butirato de dietas experimentales pre-digeridas incubadas <i>in vitro</i> durante 24 o 72 h con heces de lechones alimentados con las dietas experimentales.....	43
Cuadro 13. Contenido de MS de la digesta (%), concentraciones de lactato, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) y proporciones molares de acetato, propionato y butirato en el ciego y colon de lechones alimentados con las dietas experimentales.....	44

Índice de figuras

Figura 1. Tendencias en las producciones mundiales de maíz y sorgo desde 1994 a 2018.....	3
Figura 2. Tendencias en las producciones de maíz y sorgo en Uruguay desde 1994 a 2018.....	4
Figura 3. Cinética de la digestión acumulada de almidón (como fracción del almidón total) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados (GR) o reconstituidos y ensilados enteros (RGE) o molidos (RGM).....	23
Figura 4. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i> (mL/g MS incubada) de granos de sorgo secos (secos, control), remojados (SG) o reconstituidos y ensilados como enteros (EWG) o molidos (EGG) pre-digeridos e incubados con heces diluidas de cerdas.....	25
Figura 5. Cinética de la digestión acumulada de almidón (como fracción del almidón total) de las dietas experimentales. SEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados.....	37
Figura 6. Figura 6. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i> (mL/g MO incubada) para dietas formuladas con granos de sorgo secos (DRY), reconstituidos (REC) o cosechados con alta humedad y ensilados (ENS) pre-digeridas e incubadas con heces diluidas de lechones alimentados con las mismas dietas incubadas.....	41

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue generar información sobre tratamientos que implican la fermentación de granos de sorgo, como la reconstitución de granos secos o el ensilaje de granos cosechados con alta humedad, para aumentar el aprovechamiento digestivo del almidón cuando los granos son utilizados en la alimentación de cerdos. El estudio se desarrolló en dos experimentos. En el Experimento 1 se utilizaron diferentes abordajes *in vitro* que simulan los procesos digestivos de los cerdos, para caracterizar y predecir el aprovechamiento digestivo del almidón de varios genotipos comerciales de granos de sorgo, con diferentes contenidos de taninos, sometidos a diferentes tratamientos. En el Experimento 2, granos de sorgo de un genotipo bajo en taninos, y provenientes de un mismo cultivo fueron ensilados o reconstituidos y utilizados para formular dietas completas que fueron suministradas a lechones, donde se determinaron parámetros digestivos y metabólicos, así como productos de fermentación en el intestino grueso. En el Experimento 1 los granos fermentados mediante reconstitución tuvieron un menor contenido de taninos que los granos sin tratar, pero en los granos reconstituidos el nivel de almidón total disminuyó debido al proceso de fermentación. Además, el proceso de reconstitución provocó una mayor digestibilidad *in vitro* de los granos, y velocidades de digestión del almidón más rápidas que en los granos sin tratar. En el Experimento 2 se observaron una alta digestibilidad del almidón y una alta retención de N, que no estuvieron influidas por los tratamientos. Además, los perfiles de producción de ácidos orgánicos parecieran relacionarse con condiciones más saludables para el intestino. Se concluye que tratamientos basados en la fermentación de granos de sorgo pueden ser útiles para aumentar el aprovechamiento digestivo del almidón y reducir el contenido de taninos de los granos. Sin embargo, estos tratamientos parecen no ser necesarios para aumentar el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes cuando se utiliza un genotipo de sorgo con bajo contenido en taninos en las dietas de cerdos.

SUMMARY

The aim of this Doctoral Thesis was to generate information on treatments that involve the fermentation of sorghum grains, such as reconstitution of dry grains or ensiling of high-moisture grains, to increase the digestive usage of starch when the grains are included in diets for pigs. The study was conducted in two experiments. In Experiment 1, *in vitro* approaches that simulate the digestive processes of pigs were used to characterize and predict the digestive utilization of starch of various commercial genotypes of sorghum grains, with different tannin contents, subjected to different treatments. In Experiment 2, sorghum grains of a genotype low in tannins, and from the same crop, were ensiled or reconstituted, and used to formulate complete diets that were supplied to piglets, where digestive and metabolic parameters, as well as hindgut fermentation products were determined. In Experiment 1 the grains fermented by reconstitution had a lower tannin content than the untreated grains, but in the reconstituted grains the total starch decreased due to the fermentation process. Additionally, the reconstitution process resulted in higher *in vitro* digestibility of the grains, and faster starch digestion rates than untreated grains. In Experiment 2, high starch digestibility and high N retention were observed, which were not influenced by treatments. Furthermore, organic acid production profiles appear to be related to healthier conditions for the intestine. It is concluded that treatments based on the fermentation of sorghum grains can be useful to increase the digestive utilization of starch and reduce the tannin content of grains. However, these treatments do not appear to be necessary to increase digestive and metabolic nutrient utilization when a low tannin sorghum genotype is used in pig diets.

1. INTRODUCCIÓN

Los granos de cereales son la principal fuente de energía en dietas para las especies monogástricas. En Uruguay uno de los cereales más utilizados en alimentación animal, sobre todo en rumiantes, es el grano de sorgo, cuya producción se ha mantenido al alza en la última década. Es un grano que presenta un precio por tonelada menor al del grano de maíz, lo que lo convierte en una opción interesante como insumo energético en las dietas para cerdos y aves.

Una característica del sorgo es que su valor nutricional está muy relacionado al genotipo del grano y al procesamiento que se realice sobre el mismo. Las diferencias entre genotipos están dadas por la presencia en mayor o menor medida de kafirinas, compuestos fenólicos y fitatos, que son tres factores responsables de la utilización subóptima del almidón y de la energía del grano (Liu et al., 2015). Las kafirinas son proteínas poco solubles presentes en el endospermo del grano que limitan la digestión del almidón, los compuestos fenólicos como los taninos forman complejos indigestibles con proteínas y almidones, mientras que los fitatos pueden limitar la absorción intestinal de P, glucosa y aminoácidos (McCuiston et al., 2018). Por ejemplo, datos publicados en tablas regionales de alimentos para cerdos indican que el valor energético de granos de sorgo altos y bajos en taninos corresponden a un 88 a 99% respectivamente, del valor energético del maíz (Rostagno et al., 2017).

Diferentes tecnologías de procesamiento pueden realizarse sobre los granos de sorgo con el fin de aumentar su valor nutricional cuando son utilizados en la alimentación de cerdos. Se han reportado aumentos en el aprovechamiento digestivo de los granos a través de la molienda (Owsley et al., 1981; Healy et al., 1994), la reconstitución (Crenshaw et al., 1984; Mitaru et al., 1984a), el ensilaje (Patricio et al., 2006; Lopes et al., 2017; Bauzá et al., 2018), la peletización (Wang et al., 2019) o la extrusión (Al-Rabadi et al., 2011; Kim et al., 2002), asociándose en alguno de estos tratamientos a disminuciones en los contenidos de taninos o a modificaciones en la matriz proteica de los granos.

En esta tesis se presentan una serie de experimentos orientados a generar información sobre algunos tratamientos que implican la fermentación de granos de sorgo (reconstitución, ensilaje de granos húmedos) con el objeto de mejorar el aprovechamiento digestivo del almidón, cuando esos granos son utilizados en dietas para cerdos.

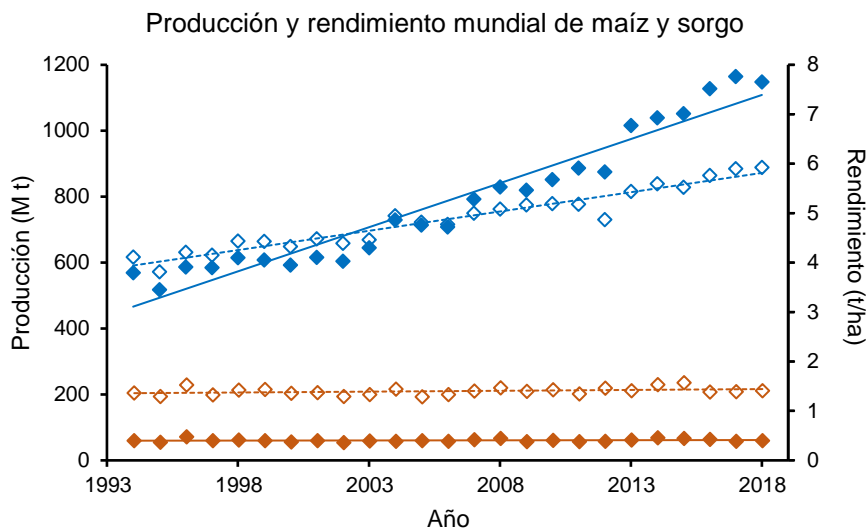
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Producción y consumo de sorgo a nivel mundial y nacional

Los granos de cereales son la principal fuente de almidones en los alimentos para animales, y los almidones constituyen la principal fuente de energía en la dieta de las especies monogástricas (Stevnebø et al., 2006). Los cereales son especies vegetales cultivadas que pertenecen a la familia Poaceae (gramíneas) que, en el caso del sorgo, el maíz o el mijo son de tipo tropicales, C4, y como tal más eficientes en la utilización de la energía lumínica en latitudes tropicales que otros cereales de tipo templado C3, como el trigo o el arroz (Taylor, 2018). El sorgo, en particular, es una especie estival de ciclo corto que crece con temperaturas de entre 24 a 27°C y que tiene bajos requerimientos hídricos y tolerancia a sequías (Mundia et al., 2019). Estas características lo posicionan como un alimento de alta relevancia para la alimentación humana y animal, y con potencial para una mayor producción, especialmente en regiones afectadas por el cambio climático (Hadebe et al., 2017).

En Uruguay el grano de sorgo es uno de los principales cereales utilizados en alimentación animal. En nuestro país, el cultivo de este cereal ha aumentado de forma sostenida en los últimos años, pasando de una producción de 84.700 toneladas en la zafra 2004/2005 a 212.000 toneladas en la zafra 2017/2018 (DIEA, 2019), destinándose exclusivamente a la alimentación animal. Es un grano que históricamente presenta un precio más favorable con respecto a otros cereales, habiendo cerrado el 2019 con un precio por tonelada de 79% respecto del precio del maíz (Cámara Mercantil de Productos del País, 2019). Además, el sorgo es un grano resistente a problemas climáticos y al ataque de insectos y hongos, lo que lo convierte en un insumo interesante para ser utilizado en sistemas de producción animal, incluyendo monogástricos.

En 2018 la producción mundial de cereales alcanzó los 2.900 millones de toneladas, siendo el maíz el de mayor producción (cerca de 1.150 millones de toneladas), seguido por el arroz, el trigo y la cebada. El sorgo ocupa la quinta posición entre los cereales de mayor producción mundial con 59 millones de toneladas producidas en 2018 (FAOSTAT, 2020), observándose producciones y rendimientos estables entre 1994 y 2018 con un promedio de 60 millones de toneladas anuales (Figura 1).



Maíz: producción (◆ —), rendimiento (◇ --). Sorgo: producción (◆ —), rendimiento (◇ --)

Figura 1. Tendencias en las producciones mundiales de maíz y sorgo desde 1994 a 2018. Elaborado a partir de datos de FAOSTAT, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Con respecto al comportamiento de la producción de sorgo en Uruguay, el rendimiento de los cultivos ha tenido un ascenso leve pero sostenido durante los últimos 25 años (Figura 2). Entre los años 1994 a 2018 se han registrado niveles medios de 150 mil toneladas anuales de grano seco, con rendimientos que superan la media mundial (3,68 t/ha vs. 1,40 t/ha, respectivamente, según datos de FAOSTAT, 2020). Estas diferencias seguramente estén relacionadas a las condiciones climáticas del país (región templada a subtropical, con precipitaciones de 1200 a 1600 mm anuales y temperaturas medias máximas y mínimas de 23 y 11 °C) y en el avance genéticos de las variedades comerciales cultivadas. Cabe destacar que la producción de grano seco en 2019 fue de 145 mil toneladas en unas 50 mil ha cultivadas, mientras que la superficie sembrada con destino a la producción de ensilaje de grano húmedo se estimó en 55 mil ha, con una producción de 189 mil toneladas (Methol, 2019), lo que indica la importancia del uso del grano de sorgo como alimento en los sistemas de producción animal del país.

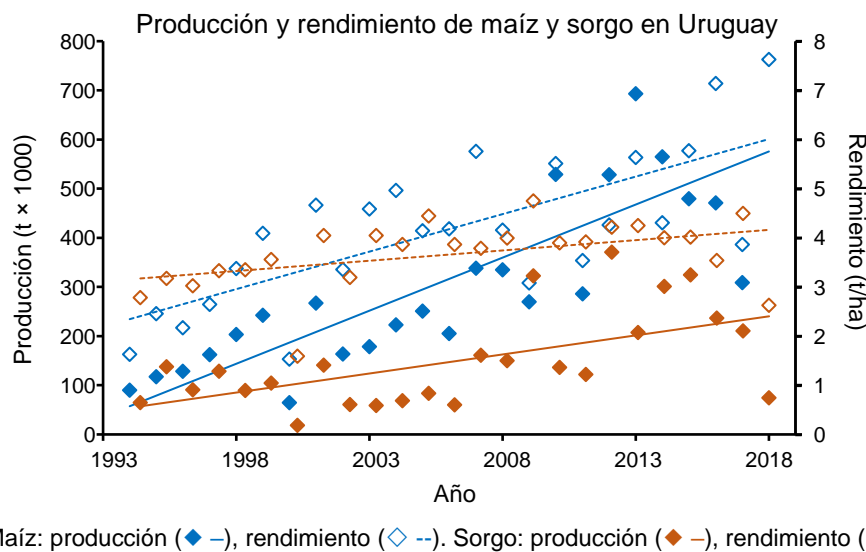


Figura 2. Tendencias en las producciones de maíz y sorgo en Uruguay desde 1994 a 2018. Elaborado a partir de datos de FAOSTAT, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Según revisan McCuistion et al. (2018), en las últimas décadas ha habido en Estados Unidos una disminución constante en el uso del sorgo para alimentación de animales de producción. Esta tendencia decreciente se explica por el aumento en la demanda del cereal a partir de otros sectores como la industria de alimentos para mascotas, la industria elaboradora de bebidas o la alimentación humana, que demuestra un mayor interés por alimentos libres de gluten, de cereales con bajos índices glicémicos, y de alimentos no sean Organismos Genéticamente Modificados. Todos estos sectores están dispuestos a pagar sobrepuestos por este cereal, lo que genera una alta competencia para las industrias porcinas y avícolas. De todas formas, los sectores ganaderos de rumiantes y de monogástricos continúan siendo consumidores importantes del grano y de subproductos del sorgo, y dadas las características del cultivo parecería ser que la tendencia general mundial es hacia el aumento de su uso.

2.2. Principales características del grano de sorgo

Los granos de cereales constan de tres componentes anatómicos característicos: el pericarpio, que es la capa más externa; el germen, que es el embrión y tejido de reserva; y el endospermo, que es el segundo tejido de almacenamiento y donde se dispone el almidón. En el caso del grano de sorgo, la proporción relativa de estos componentes varía según el genotipo del grano y el ambiente donde se desarrolle el cultivo, pero en general el sorgo contiene 84% de endospermo, 9% de germen y 7% de pericarpio (Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019). El pericarpio se divide en tres tejidos histológicos: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. La capa más externa, el epicarpio, está cubierta por una capa delgada de cera llamada cutina que forma una cubierta impermeable que impide que el grano pierda humedad. El pericarpio del sorgo puede presentar diferentes coloraciones,

siendo una característica controlada genéticamente por los genes *R* y *Y*. La combinación de estos genes puede producir coloraciones blancas (*R-yy* o *rryy*), amarillas (*rrY-*) o rojas (*R-Y-*), mientras que el grosor del pericarpio está controlado por el gen *Z* (Serna-Saldivar and Espinosa-Ramírez, 2019). En general, los pericarpios gruesos enmascaran el color de tejidos subyacentes, como la testa y del endospermo.

Algunos genotipos de sorgo tienen por debajo del pericarpio una capa de células llamada testa; la presencia de la testa está controlada por los genes *B₁* y *B₂*. Una característica importante en estos genotipos, es que en la testa puede contener taninos condensados, que son compuestos fenólicos que afectan de forma adversa el valor nutricional y la aceptabilidad del grano, pero confieren al cultivo mayor resistencia al ataque de pájaros y hongos (Blakely et al., 1979). De esta forma, la presencia de la testa permite dividir a los diferentes genotipos de sorgo en tres clases generales: granos de tipo I sin testa pigmentada y sin niveles significativos de taninos, granos de tipo II con testa pigmentada y con un gen esparcidor recesivo y granos de tipo III con testa pigmentada y con un gen esparcidor dominante (Earp et al., 2004). Los sorgos con testa pigmentada (*B₁- B₂-*) que contienen un gen esparcidor dominante (*S-*), presentan coloración marrón en el pericarpio y contienen taninos condensados (Kim et al., 2000). En general es común asociar la oscuridad del color del grano de sorgo a su contenido de taninos. No obstante, Boren y Waniska (1992) analizaron la coloración y el contenido de taninos en diferentes genotipos de granos de sorgo y observaron que los granos con altos contenidos en taninos tenían algunos de los colores más oscuros, pero esto no ocurría en todos los genotipos, concluyendo que el color del grano es un mal indicador del contenido de taninos. Esto puede deberse a que el contenido de taninos en los granos varía con la presencia y el grosor de la testa: si la testa está presente el sorgo tendrá taninos, pero si la testa está ausente el sorgo no los tendrá, independientemente del color del grano.

Por otra parte, las condiciones ambientales pueden afectar de forma negativa la calidad y el aspecto del grano, como consecuencia del ataque de hongos e insectos. Los granos que son atacados por insectos y hongos secretan compuestos fenólicos produciendo manchas, decolorando el grano y afectando los resultados del procesamiento de los granos. Los granos de sorgo con pericarpio delgado, taninos condensados, endospermo córneo y glumas grandes y compactas, generalmente se consideran más resistentes a condiciones ambientales adversas (Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019; Waniska et al., 1989).

El endospermo de los cereales es el tejido central del grano, y donde se dispone el almidón en forma de gránulos. El endospermo se divide en dos capas: una periférica compuesta por gránulos embebidos en una matriz rica en proteínas llamado endospermo córneo, y otra central con una mayor concentración de gránulos de almidón que no están incrustados en una matriz proteica, denominado endospermo harinoso (Huntington, 1997). El endospermo córneo es más compacto, con gránulos de almidón más comprimidos y una matriz proteica continua, mientras que el endospermo harinoso tiene

una estructura más laxa, con gránulos de almidón sueltos y una matriz proteica discontinua (Bean et al., 2019). El almidón del endospermo harinoso es, por tanto, más susceptible a agentes externos como enzimas digestivas o procesamientos del grano. Si bien estas características son generales a todos los cereales, granos como el sorgo y el maíz se caracterizan porque en su endospermo predomina el de tipo córneo. Dentro de los cereales, el sorgo es el que generalmente presenta menor digestibilidad del almidón, y esto puede deberse a que el endospermo córneo es resistente a la penetración y ataques enzimáticos (Rooney y Pflugfelder, 1986). Existen variedades céreas de sorgo que presentan una proporción más pequeña de endospermo córneo, tienen matrices proteicas de menor densidad y gránulos de almidón de mayor tamaño que las variedades comunes (Sullins y Rooney, 1975). Además, las variedades céreas tienen una mayor proporción de amilopectina que de amilosa, los dos polímeros principales que componen el almidón, y distintas propiedades químicas, físicas, térmicas y reológicas del almidón dependen de la relación entre estos dos polímeros (Sang et al., 2008). Algunos de estos aspectos serán revisados a continuación.

2.3. Particularidades del almidón en el sorgo

El principal componente del grano del sorgo es el almidón, cuyo contenido se ubica en un rango entre 55,6 a 75,2% en base seca. La amilopectina es el polímero predominante representando el 75% del almidón, mientras que la amilosa constituye alrededor del 25% (Liu et al., 2015; Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019). La relación amilosa:amilopectina de los genotipos de sorgo contribuye a diferencias en las tasas y magnitudes de digestión del almidón. Se ha reportado que la digestión *in vitro* del almidón en variedades céreas de sorgo (0% amilosa) fue mayor que en variedades con contenidos bajos (14%) o normales (25%) de amilosa (Sang et al., 2008). Del mismo modo, Martens et al. (2018) observaron que el aumento en el contenido de amilosa en el almidón de diferentes fuentes se relaciona negativamente con las tasas de digestión del almidón. De todas formas, Shelton et al., (2004) al analizar el efecto de variedades céreas y no céreas de granos de sorgo sobre el crecimiento, características de la canal y cinéticas de glucosa e insulina en cerdos, observaron que las dietas conteniendo sorgo céreo tuvieron efectos mínimos sobre el crecimiento y las características de la canal, y ambas variedades de sorgo no difirieron respecto a las respuestas que provocaron sobre las cinéticas de glucosa e insulina en sangre. Por otra parte, Bird et al. (2007) reportaron mayores digestibilidades ileales del almidón en dietas lechones conteniendo almidón céreo de maíz con respecto a almidones de maíz con contenidos de 85% de amilosa. Sin embargo, el tipo de almidón empleado en las dietas no se relacionó con el crecimiento o el consumo de alimento en los animales. Los efectos de las variedades céreas de sorgo parecen relacionarse con mayores digestibilidades del almidón dada la estructura ramificada de la amilopectina que favorece su hidrólisis enzimática. De todas formas, otras características de los granos como su relación con la matriz proteica, tamaño de los

gránulos de almidón o factores anti-nutricionales presentes en los granos, pueden estar relacionadas con las respuestas de performance productiva observada en los animales.

Además de los factores mencionados anteriormente, el almidón del sorgo tiene algunas características particulares que dificultan su aprovechamiento digestivo. Se ha reportado que la digestibilidad ileal del almidón y la digestibilidad aparente de la energía del sorgo medida en cerdos se ubicó en 0,89 para ambos nutrientes, siendo más baja que en otros granos de cereales como el maíz, el arroz, la avena o el trigo (Cervantes-Pahm et al., 2014). En el mismo sentido, Truong et al. (2016a) reportaron que al analizar datos de 11 estudios donde se midió la digestibilidad ileal del almidón de diferentes cereales en pollos, el maíz presentó una digestibilidad ileal promedio de 0,95, mientras que en 7 estudios donde se midió la digestibilidad ileal de granos de sorgo el promedio de este parámetro fue de 0,88, lo que indica una menor digestibilidad intestinal del almidón del sorgo con respecto al maíz. Aparentemente, estas diferencias entre granos pueden producirse no sólo por factores que afectan la digestibilidad del almidón en sí misma (como la relación amilosa:amilopectina), sino que factores extrínsecos que generen impactos negativos sobre la digestibilidad del almidón y otros nutrientes. En el mismo sentido, y al comparar diferentes granos de cereales Giuberti et al., (2012a) reportaron que la digestibilidad *in vitro* del almidón de granos de sorgo fue menor que la de otros cereales, como maíz, trigo, arroz, avena y cebada. En ese estudio, la caracterización de los almidones indicó que el sorgo presentó los niveles más altos de almidón resistente y los más bajos de almidón de digestión rápida, lo que se asoció con los menores índices de hidrólisis del almidón (HI) e índices de glicemia predichos (*IGp*), parámetros que son útiles para predecir la respuesta de los animales cuando estos cereales se incluyen en las dietas de cerdos.

2.4. Factores del sorgo que limitan el uso de nutrientes

Si bien, la composición química del sorgo es similar a la del maíz, en general el sorgo se asocia a menores niveles de productividad animal cuando se utiliza en dietas de monogástricos. Existen tres factores inherentes al sorgo que son responsables de una menor utilización del almidón y de la energía en los monogástricos que son (i) las prolaminas del sorgo, llamadas kafirinas, que son las proteínas más abundantes en el grano, (ii) compuestos fenólicos, incluyendo taninos, y (iii) la presencia de fitatos. Si bien el almidón del sorgo no es de por sí problemático, estos tres factores pueden combinarse comprometiendo la utilización del almidón y de la energía del grano (Liu et al., 2015).

2.4.1. Kafirinas

Las kafirinas constituyen la fracción predominante de las proteínas del sorgo, representando, según Bean et al. (2019), entre el 50 y 70% de las proteínas totales del grano, aunque otros autores indican que pueden variar entre el 23 y el 43% de las proteínas totales (Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019). Se ha reportado que esas

concentraciones varían dependiendo de la selección de los granos, pudiendo aumentar con un mayor nivel de fertilización nitrogenada de los cultivos (Reis de Souza et al., 2019; Selle et al., 2013). Las kafirinas se dividen en varias subclases dependiendo de la secuencia de aminoácidos y propiedades químicas de las proteínas. Las más abundantes son las α -kafirinas, representando entre un 80 a 84% de las prolaminas del endospermo córneo y entre un 66 a 71% del endospermo harinoso. Las γ -kafirinas son cuantitativamente las segundas en importancia, y representan aproximadamente un 20% de las prolaminas, tienen un elevado contenido de cisteína y por tanto tienen un rol importante en la formación de complejos de proteínas poliméricas con enlaces disulfuro. Las β -kafirinas constituyen entre un 7 y 13% de las prolaminas, tienen un elevado contenido en aminoácidos azufrados, y al igual que las γ -kafirinas tienen un rol importante en la formación de enlaces disulfuro. Las δ -kafirinas son las menos abundantes, representando aproximadamente un 1% de las prolaminas, son ricas en metionina y tienen bajo peso molecular (Bean et al., 2019; Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019).

El valor nutricional de las kafirinas es bajo dada su escasez de aminoácidos esenciales. Tomando en cuenta la concentración media en aminoácidos de las kafirinas de dos variedades de granos de sorgo reportadas por Truong et al. (2016b) y comparadas con el contenido de aminoácidos recomendados para dietas de cerdos de entre 11 y 25 kg de peso vivo (NRC, 2012), se observa una escasez en los contenidos de lisina, metionina, treonina, histidina, valina, isoleucina y fenilalanina. A esto se suma una baja digestibilidad de aminoácidos debido a su hidrofobicidad y a los enlaces disulfuro que se producen entre las fracciones de β - y γ -kafirinas. Estas kafirinas se localizan en periferia del cuerpo proteico, e impiden la digestión del núcleo central de α -kafirina, y este proceso se acentúa por el procesamiento hidrotérmico del grano ya que con éstos también se inducen la formación de enlaces disulfuro (Liu et al., 2015). En este sentido, Balderrama-Pérez et al. (2019) reportaron mayores digestibilidades ileales de proteínas y aminoácidos en dietas de cerdos conteniendo maíz y sorgo, sugiriendo mayores digestibilidades de las prolaminas del maíz, y mayor dificultad en la digestión cuando aumenta el contenido de γ -kafirinas en los sorgos. A pesar del bajo valor de las kafirinas como proteína, su nivel en las dietas de los monogástricos es reducido (por ej. se ubicaría entre un 15 y un 20% de la proteína total si la dieta contuviera 60% de sorgo), por lo que, por sí mismas pueden no representar necesariamente un factor decisivo para la utilización de los nutrientes.

Sin embargo, existen mecanismos por los que las kafirinas reducen el aprovechamiento digestivo del almidón. Este hecho parece deberse a uniones que se producen entre los cuerpos proteicos de kafirina, los gránulos de almidón y las matrices de la proteína glutelina en el endospermo (Liu et al., 2015). Además, Taylor et al. (2007) reportaron que las γ -kafirinas tienen mayor afinidad de unión con taninos condensados, lo que puede reducir la digestibilidad de las proteínas del grano. De todas formas, estos mecanismos no están totalmente dilucidados, dado que Reis de Souza et al. (2019) observaron que la inclusión de sorgos conteniendo diferentes niveles de kafirinas y taninos en dietas para

cerdos, no influyó sobre la digestibilidad ileal del almidón ni sobre la respuesta de glicemia posprandial, aunque sí deprimieron la digestibilidad ileal de algunos aminoácidos. Estos autores concluyeron que los niveles de kafirinas parecen no ser un factor perjudicial para la eficiencia con la que los cerdos utilizan los nutrientes de la dieta cuando los niveles de taninos de los granos son bajos.

2.4.2. Compuestos fenólicos

El sorgo se caracteriza por contener niveles de compuestos fenólicos más altos que otros granos de cereales. Los compuestos fenólicos presentes en los granos de sorgo se dividen en dos grandes grupos, los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los ácidos fenólicos son derivados de los ácidos benzoico y cinámico, mientras que los flavonoides incluyen a los taninos y antocianinas como los grupos de mayor relevancia (Awika and Rooney, 2004). Los compuestos fenólicos se concentran en las capas más externas de los grano, sobre todo en el pericarpio y en la testa, y actúan como una defensa natural de las plantas contra plagas y fitopatógenos (Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019). Los contenidos de estos compuestos en los granos de sorgo varían dependiendo de la variedad y el color del grano; de esta forma, los sorgos coloreados tienen un mayor contenido de compuestos fenólicos totales, especialmente los de pericarpio oscuro, mientras que los sorgos blancos sin testa pigmentada contienen las menores cantidades. Pan et al. (2019) evaluaron el aprovechamiento digestivo de la energía del maíz y de diferentes variedades de sorgos blancos (libres de taninos) y rojos (altos en taninos) para cerdos y concluyeron que, aunque las kafirinas y compuestos fenólicos se relacionan negativamente con el valor energético de los sorgos, los taninos condensados son los factores anti-nutricionales más determinantes.

Los taninos son los compuestos fitoquímicos más relevantes y probablemente más estudiados del sorgo, ya que tienen efectos perjudiciales sobre la utilización de los nutrientes, aunque también se asocian a algunos impactos positivos sobre características agronómicas de los cultivos, como resistencia al ataque de pájaros o a la contaminación por hongos (Audilakshmi et al., 1999). Además, se ha reportado el efecto nutracéutico de incluir alimentos con taninos en las dietas, ya que los taninos poseen efectos antioxidantes, modulan las repuestas de glicemia postprandiales y reducen el colesterol (Awika y Rooney, 2004). En líneas generales, los taninos se clasifican en dos categorías, taninos hidrolizables y taninos condensados; los primeros están compuestos por un núcleo central alcohólico y grupos hidroxilo esterificados por ácido gálico o ácido hexahidroxidifénico, mientras que los condensados son polímeros de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles (Chung et al., 1998). Tal cual revisan estos autores, los taninos condensados son más predominantes en los alimentos y de mayor preocupación cuando se discuten los efectos anti-nutricionales de los taninos.

Los taninos condensados provocan disminuciones en el uso de nutrientes y en el rendimiento productivo de cerdos (Lizardo et al., 1995; Mariscal-Landín et al., 2004; Pan et al., 2016) y aves (Kumar et al., 2005; Mitaru et al., 1983). Como se mencionó anteriormente, las diferentes variedades de sorgo pueden ser divididas en tres categorías dependiendo del genotipo, la presencia de testa y el contenido en taninos condensados. Los de tipo I carecen de testa pigmentada y son libres de taninos, los de tipo II tienen una testa pigmentada que contiene taninos condensados, mientras que los de tipo III contienen taninos condensados tanto en la testa como en el pericarpio (Liu et al., 2015). Las concentraciones de taninos condensados en los sorgos de tipo I, II y III son 0,28, 4,48 y 11,95 g/kg respectivamente, según lo reportado por Dykes y Rooney (2006).

Además de los taninos, en los granos de sorgo pueden encontrarse otros compuestos fenólicos. Existen variedades de sorgos de color rojo, libres de taninos, que están pigmentadas con polifenoles, antocianinas y antocianidinas, y estos compuestos fenólicos pueden unirse fuertemente a los almidones disminuyendo su digestión (Liu et al., 2015). Khoddami et al. (2015) caracterizaron concentraciones de compuestos fenólicos de distintas variedades de sorgos rojos libres de taninos condensados, incorporaron esos granos a dietas para pollos, y observaron que compuestos fenólicos como el ácido ferúlico y el p-cumárico influyeron negativamente en la utilización de la energía de las dietas, lo que indica que compuestos fenólicos diferentes a los taninos tienen efectos adversos sobre la utilización de los nutrientes. Esto se debe a que los compuestos fenólicos forman complejos con polisacáridos, incluyendo el almidón, que los sorgos rojos libres de taninos están pigmentados con polifenoles, antocianinas y antocianidinas, y que estos fenólicos al unirse fuertemente al almidón, sobre todo a la amilosa, disminuyen su digestión. Además, se ha reportado que los taninos y demás compuestos fenólicos (Manzano y Williamson, 2010; Welsch et al., 1989), son capaces de inhibir la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^++\text{ATPasa}$ a nivel de membras celulares intestinales lo que compromete la absorción de nutrientes como la glucosa o aminoácidos, que necesitan de sistemas de transportadores dependientes del Na^+ para ser absorbidos.

Como los compuestos fenólicos se ubican en la periferia del grano, en el pericarpio y la capa de aleurona, en granos de sorgo enteros difícilmente se produzcan reacciones entre compuestos fenólicos y gránulos de almidón, ya que estos últimos se ubican en la región central de grano. Sin embargo, procesamientos físicos, como la molienda o el granulado (peletizado) de los granos, permiten que ese contacto se produzca (Liu et al., 2015). Se ha reportado que diferentes formas de procesamiento del grano como el extrusado, el decortinado o el descascarado permiten reducir el contenido de compuestos fenólicos (Dlamini et al., 2007). A nivel nacional, Bauzá et al. (2016) observaron que el extrusado y el ensilado son procesamientos que llevan a que el aporte de nutrientes para cerdos de sorgos altos en taninos sea similar al del grano de maíz, efectos que estarían relacionados con la reducción en el contenido de taninos o a la disminución de la interacción de éstos con los nutrientes.

2.4.3. Fitatos

El ácido fítico o fitato, es un ácido orgánico presente en los vegetales que contienen P y cuya función principal es la de almacenar P e inositol para que sean utilizados de forma gradual en la germinación de las semillas (Serna-Saldivar y Espinosa-Ramírez, 2019). La repercusión nutricional es que los fitatos, además de reducir la disponibilidad del P, forman complejos con minerales dietéticos esenciales como Ca, Zn, Fe y Mg haciéndolos inaccesibles para la absorción intestinal. La baja disponibilidad del P unido a fitatos en las especies monogástricas lleva a que el exceso de P excretado contribuya al aumento de la contaminación ambiental, fundamentalmente en áreas con una alta densidad de producción animal (Humer et al., 2015). Además, los niveles de fitatos en el sorgo son más elevados que en otros granos de cereales como el maíz o el arroz (Marfo et al., 1990), pudiendo representar del 80 al 87% del P total del grano (Doherty et al., 1982). Los fitatos se localizan principalmente en la capa de aleurona del grano, y tratamientos como la molienda y decorticación (Mahgoub y Elhag, 1998), así como el malteado (Elkhalil et al., 2001), la fermentación (Marfo et al., 1990) o vaporización (copos al vapor; Wu et al., 2018) del grano reducen su cantidad .

Por otra parte, los fitatos pueden disminuir la digestión del almidón de forma directa, uniéndose al almidón mediante enlaces fosfato, o de forma indirecta formando complejos con proteínas asociadas a los gránulos de almidón (Liu et al., 2015). Estas uniones fosfato – proteína varían con el punto isoeléctrico proteico y con el pH del medio. Además, y similar a lo que ocurre con los compuestos fenólicos, los fitatos pueden interferir con la actividad de la bomba de Na⁺ y con la captación intestinal de glucosa, por lo que ambos compuestos comprometen la absorción intestinal de glucosa y aminoácidos vía los sistemas transportadores dependientes del Na⁺ (Liu et al., 2008). La suplementación de las dietas de cerdos y aves con fitasas tiene un efecto positivo sobre la absorción de P, Ca, almidón y aminoácidos (Humer et al., 2015; Zouaoui et al., 2018). Sin embargo, según revisan Liu et al. (2015), las respuestas favorables que se observan en la digestión del almidón y proteínas al incluir fitasas en dietas para pollos basadas en sorgo son menores en comparación con dietas basadas en maíz y trigo, debido a que los fitatos no pueden unirse fácilmente a las kafirinas del sorgo debido a la escasez de aminoácidos básicos en estas proteínas, a la estructura esférica del cuerpo proteico y a su periferia hidrófoba.

2.5. Procesamiento del grano de sorgo

Como fue mencionado anteriormente, dada las características de su endospermo y por presentar algunos factores anti-nutricionales, el grano de sorgo sin procesar se caracteriza por tener un valor nutricional por debajo del promedio de otros granos de cereales. Por lo tanto, las formas de procesamiento que se realicen sobre el grano pueden ser claves para aumentar su valor nutricional. Los principales métodos de procesamiento para elaborar alimentos basados en el grano de sorgo incluyen la molienda, la producción

de copos al vapor, la granulación, la expansión, la extrusión o la irradiación, aunque varios factores como el tamaño y uniformidad de las partículas luego de la molienda, las temperaturas utilizadas para la granulación o la extrusión y si se emplea o no humedad, influyen sobre el valor nutricional del producto final (Liu et al., 2013). El tratamiento físico del sorgo (quebrado, aplastado, molido) disminuye el tamaño de partícula y se asocia con mayores índices productivos (Healy et al., 1994; Paulk et al., 2015) y digestibilidad ileal de los nutrientes (Owsley et al., 1981).

Por otra parte, el objetivo de realizar tratamientos térmicos como la granulación o la extrusión es asegurar la gelatinización del almidón para optimizar el aprovechamiento digestivo de la energía de las dietas (Hongtrakul et al., 1998). No obstante, en ocasiones los tratamientos térmicos que provocan cocción por vapor del sorgo pueden comprometer su valor nutricional y sobre todo el de su fracción proteica, debido a que estos procesos pueden generar la formación de enlaces disulfuro entre kafirinas, reduciendo su solubilidad (Selle et al., 2014).

También existen tratamientos que involucran la fermentación de los granos o la adición de ácidos o álcalis para aumentar el aprovechamiento digestivo de los nutrientes. Dos de estos tipos de tratamientos, la reconstitución y el ensilaje, fueron estudiados en esta tesis. Estos tratamientos se basan en el almacenaje de granos con niveles de humedad mínimas del 25% en un contenedor hermético libre de oxígeno para que pueda producirse la fermentación de los granos, con producción de ácidos orgánicos, permitiendo la conservación por bajo nivel de pH en el medio. Además, con estos tratamientos se produce la disgregación del endospermo córneo, fragmentando las células de su pared y su matriz proteica, permitiendo exponer los gránulos de almidón a la acción de enzimas (Beta et al., 2000; Gollcher et al., 2010; Rooney y Pflugfelder, 1986), mejorando así el aprovechamiento digestivo de los nutrientes. El ensilaje de granos cosechados húmedos pueden provocar la disminución en el contenido de prolaminas debido a una degradación de estas proteínas durante el proceso de ensilaje, además de un menor contenido de las mismas en estados de maduración más temprana al momento de la cosecha de los granos (Giuberti et al., 2014).

Además, el tratamiento de los granos de sorgo mediante reconstitución y ensilaje se asocian a disminuciones en los contenidos de taninos condensados, lo que permite aumentar el valor nutricional del grano. A través de la reconstitución (agregado de agua al grano seco para que pueda ser fermentado) de granos de sorgo, se han reportado disminuciones en los contenidos de taninos condensados de los granos, conjuntamente con incrementos en la digestibilidad de la materia seca, proteína y aminoácidos de dietas que contienen granos tratados en cerdos (Mitaru et al., 1984a, 1984b) y en aves (Mitaru et al., 1983). Estos efectos también fueron descritos en rumiantes por Aguerre et al., (2015) al reconstituir diferentes variedades de granos sorgo altos y bajos en taninos, y

observando disminuciones en los contenidos de taninos que se asociaron a una mayor degradabilidad y aprovechamiento digestivo de los granos.

Por otra parte, el ensilaje de granos de sorgo cosechados con alta humedad también puede asociarse a cambios en el valor nutricional del cereal. En este sentido, Crenshaw et al. (1984) observaron mayores contenidos en energía metabolizable de granos ensilados al ser evaluados en cerdos, así como Myer et al. (1986) también reportaron mayores utilidades de los nutrientes en dietas para cerdos conteniendo granos de sorgo ensilados con alta humedad; los cambios reportados por estos autores estuvieron asociados a disminuciones los contenidos de taninos de los granos.

Sumado a lo anterior, Patricio et al. (2006) observaron que dietas para cerdos en crecimiento conteniendo ensilajes de grano húmedo de sorgo altos y bajos en taninos presentaron una completa digestibilidad del almidón, y que el sorgo utilizado como grano húmedo puede sustituir la totalidad del maíz de la dieta. También, se ha reportado que el proceso de ensilaje de una variedad de sorgo alto en taninos provocó disminuciones en los contenidos de taninos condensados e hidrolizables, observándose que cerdos que recibieron dietas conteniendo esos granos presentaron similares consumos de alimento, ganancias diarias de peso y conversión alimenticia que los alimentados con dietas conteniendo maíz (Lopes et al., 2017). Además, Barcellos et al. (2006) observaron que la inclusión gradual de granos de sorgo ensilados altos en taninos a expensas de maíz en dietas para pollos produjo una disminución lineal en el consumo de alimento, en la ganancia diaria de peso y en la conversión de alimento, indicando que las variedades altas en taninos ensiladas pueden reemplazar hasta el 33% del maíz en dietas para parrilleros. De todas formas, a pesar del impacto positivo de la fermentación de los granos sobre el aumento en su valor nutricional, en la literatura revisada los parámetros productivos (consumo, ganancias de peso, índices de conversión) no consistentes en todos los casos, debido a diferencias entre las variedades de sorgo utilizadas, los niveles de inclusión en las dietas y las categorías animales en las que se realizaron las evaluaciones.

2.6. Consideraciones adicionales sobre la reconstitución y ensilaje de granos de sorgo para cerdos.

Además de los efectos positivos sobre el aprovechamiento digestivo de los granos, los procesos de reconstitución y ensilaje con alta humedad de cereales se vinculan a menores niveles de recuentos de hongos toxicogénicos y de contaminación con micotoxinas (del Palacio et al., 2016; Wambacq et al., 2016; García y Santos et al., 2020), lo que estaría dado por limitaciones en el crecimiento de los hongos y por degradación de las micotoxinas a consecuencia del bajo pH dentro del silo. Estas formas de procesamiento de los granos de sorgo son potencialmente favorables para reducir la presencia de micotoxicosis en las granjas.

Es importante señalar que los granos de cereales fermentados, ya sea por reconstitución o por ensilaje de granos con alta humedad, son formas de procesamiento que pueden realizarse dentro de los predios, y ser utilizados en combinación con otros ingredientes secos en sistemas de alimentación secos, o combinarse con subproductos líquidos de agroindustrias (suero de queso, yogur, etc.) en sistemas de alimentación líquida (de Lange y Zhu, 2012; Llanes y Gozzini, 2013). Sin embargo, es necesario considerar que el grano está sujeto a deterioro luego de retirarse del silo y entrar en contacto con el aire del ambiente (Merry y Davies, 1999), por lo que se sugiere que la entrega de la dieta conteniendo grano fermentado a los cerdos se haga diariamente, o incluso varias veces en el día, teniendo en cuenta que a mayor temperatura ambiente el proceso de deterioro se acelera (Hawton et al., 1980).

En cualquier caso, los tratamientos que se realicen sobre los granos de sorgo tienen que repercutir en aumentos en la utilización de nutrientes que justifiquen su implementación, o que permitan sustituir otras fuentes de cereales de mayor costo en las dietas, sin que esto provoque un perjuicio en la productividad de los animales o en los productos finales obtenidos. El costo de producción de un cultivo de sorgo granífero en 2020 era de unos U\$S 570/ha, incluyendo costos de insumos, labores y costos post-cosecha de fletes, entrada y salida de planta, y secado (SOFOVAL, 2020), lo que resulta en una producción de grano con un costo final de unos 127 U\$S/t considerando un rendimiento del cultivo de 4,5 t/ha. Al cosechar los granos de forma anticipada con alta humedad y ensilarlos dentro del establecimiento se reducen los costos de producción, principalmente los relacionados a transporte, envío a planta, secado y almacenamiento, teniendo que considerarse los costos de producción del ensilaje (Chalkling y Brasesco, 1997); esto permitiría producir un grano con un costo aproximado de 113 U\$S/t. Diferente sería el costo de producción de sorgo reconstituido tomando en cuenta que el grano de sorgo en 2020 tuvo un precio medio de comercialización de 165 U\$S/t, debiendo sumarse el costo de molienda, remojado y almacenaje en anaerobiosis, aunque la implementación de esta estrategia estaría supeditada a la oportunidad de compra de granos y al mejoramiento de variedades menos digestibles (por ej. con mayores contenidos de taninos).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento sostenido en la producción nacional de grano de sorgo, conjuntamente con un menor costo relativo de este cereal con respecto a otros, lo posicionan como una fuente energética muy interesante para ser incluida en las dietas de monogástricos. De todas formas, para que se justifique el reemplazo de granos más digestibles por sorgo, las respuestas biológicas obtenidas con este último deberían ser equivalentes.

Debido a que las características intrínsecas del grano de sorgo lo hacen menos digestible (presencia de taninos, kafirinas, fitatos, ya comentados en el apartado anterior), el procesamiento del grano previo a su utilización en alimentación de monogástricos se vuelve prácticamente indispensable. En este sentido, es necesario que existan métodos de procesamiento que sean efectivos para mejorar el aprovechamiento digestivo del almidón del grano, que sean aplicables a nivel de las granjas, y que puedan implementarse en sistemas de alimentación líquida o seca.

Existen diversos reportes del efecto del ensilaje del grano húmedo, o la reconstitución (hidratado del grano seco para posteriormente ensilarlo) de granos de sorgo sobre parámetros productivos y digestivos en monogástricos, aunque no hemos encontrado información sobre el impacto de estos tratamientos sobre las cinéticas y magnitud de digestión del almidón, o del uso digestivo y metabólico de dietas formuladas con estos granos en cerdos. Además, es necesario intentar dilucidar si los cambios observados en el valor nutricional de los granos y en las respuestas animales se relacionan a efectos sobre el contenido de compuestos fenólicos, a modificaciones en la matriz proteica de los granos o a ambos. Con esta tesis, se pretende evaluar el impacto que pueden tener algunas formas de procesamiento sobre la utilización de los nutrientes cuando el grano de sorgo es utilizado en alimentación de cerdos, profundizando en algunos aspectos de la digestión del mismo.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

A partir de la literatura consultada y a experimentos previos de nuestro grupo de trabajo observamos que algunos tratamientos, fácilmente implementables en los sistemas productivos, pueden ser útiles para aumentar el valor nutricional de los granos de sorgo.

De esta forma, las hipótesis que nos planteamos fueron:

- tratamientos como la reconstitución y el ensilaje causan la reducción en el contenido de taninos de los granos, por lo que la aplicación de esos tratamientos podría relacionarse con incrementos en las cinéticas de digestión del almidón, aumentando el valor energético y nutricional de los granos de sorgo al ser utilizados en alimentación de cerdos.
- Dietas completas para cerdos que contengan granos de sorgo fermentados deberían asociarse a una mayor utilización digestiva y metabólica de los nutrientes.

4.2. Objetivo general

Estudiar de qué manera tratamientos que impliquen la fermentación de granos de sorgo influyen sobre el aprovechamiento digestivo de los nutrientes cuando el grano es utilizado en alimentación de cerdos.

4.3. Objetivos específicos

Determinar si la reconstitución o el ensilaje de granos de sorgo influyen sobre:

- la magnitud y cinéticas de digestión del almidón de los sorgos en intestino delgado y de fermentación en intestino grueso.
- el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes de dietas que contienen esos granos, suministradas a lechones.
- la magnitud y cinéticas de digestión del almidón y de fermentación de dietas que contienen esos granos, suministradas a lechones.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se desarrolló en dos experimentos consecutivos y complementarios. En el Experimento 1 se utilizaron diferentes abordajes *in vitro* que simulan los procesos digestivos de los cerdos, para caracterizar y predecir el aprovechamiento digestivo del almidón de varios genotipos comerciales diferentes de granos de sorgo sometidos a diferentes tratamientos. En el Experimento 2 granos de sorgo provenientes de un mismo cultivo se sometieron a tratamientos similares a los evaluados en el Experimento 1, y se evaluó la digestión y la cinética de digestión cuando fueron utilizados en la formulación de dietas completas para lechones. De esta forma, en este segundo experimento, utilizando lechones en post-destete, se estudiaron el aprovechamiento digestivo de los nutrientes y las cinéticas de digestión y de fermentación de las dietas.

5.1. Experimento 1

5.1.1. Introducción y objetivos

A partir de experimentos previos de nuestro grupo de trabajo realizados en rumiantes se observó que tratamientos aplicados sobre granos de sorgo como la reconstitución y el ensilaje causaron reducciones en el contenido de taninos de los granos, y en consecuencia aumentos en la fermentabilidad *in vitro*, con cambios en la digestibilidad ruminal e intestinal del almidón (Aguerre et al., 2015). Esto condujo a la hipótesis de que la aplicación de esos tratamientos sobre los granos de sorgo también podría relacionarse con incrementos en las cinéticas de digestión del almidón en animales monogástricos, aumentando así su valor energético y nutricional en estas especies. Para testar esta hipótesis caracterizamos las cinéticas de digestión del almidón y de fermentación de granos de sorgo remojados y reconstituidos para ser usados en alimentación de cerdos, a través de métodos *in vitro*.

5.1.2. Materiales y métodos

Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (FVET) de la UdelaR, Uruguay (CEUAFVET-PI 488/17). Para el estudio, analizamos una colección de muestras de granos de sorgo utilizados en un trabajo previamente publicado por nuestro grupo (Aguerre et al., 2015). La colección consistió en granos de sorgo de 5 parcelas comerciales demostrativas de 10 m × 30 m de superficie, separadas entre sí por pasillos de 10 m de ancho y ubicadas en el mismo predio. Cada parcela correspondió a un genotipo comercial diferente de sorgo granífero: Jowar Food (grano blanco, bajo en taninos), 3034 (grano rojo, alto en taninos), Flash 1 (grano rojo, alto en taninos), Flash 10 (grano rojo, bajo en taninos) y BRM 1000 (grano rojo, alto en taninos) de la empresa IPB®, San José, Uruguay. Los granos se

recolectaron en un mismo día de los cultivos, como granos secos maduros, y se sometieron a cuatro tratamientos postcosecha:

- 1) grano molido seco (SEC),
- 2) grano remojado durante 24 h (GR),
- 3) grano reconstituido y ensilado durante 21 días como grano entero (RGE) o,
- 4) grano reconstituido y ensilado durante 21 días como grano molido (RGM).

Para los tratamientos seco (1) y reconstituido molido (4), los granos se molieron en un molino con un tamaño de tamiz de 3 mm. Para el tratamiento GR los granos enteros se remojaron con cantidades iguales de grano y agua durante 24 h, luego se drenó el agua y los granos se congelaron hasta su análisis. Para los tratamientos RGE y RGM los granos (enteros o molidos) fueron rehidratados hasta lograr una humedad de 300 g/kg, luego fueron depositados en baldes plásticos de 5 kg de capacidad, compactados con una prensa manual, sellados herméticamente y mantenidos en anaerobiosis durante 21 días en un cuarto oscuro a 20°C para asegurar que el proceso de fermentación a partir de la microbiota epifítica fuera completo y el ensilaje estabilizado.

5.1.2.1. Digestión *in vitro* del almidón

Para caracterizar la digestión *in vitro* del almidón se utilizó un procedimiento que permite evaluar alimentos almidonosos, y que consiste en una hidrólisis enzimática en dos etapas, simulando los procesos de digestión gástrica y pancreática de un cerdo (Giuberti et al., 2012a). Muestras de los granos de sorgo fueron molidas a un tamaño de 1 mm, y de estas 800 mg se colocaron en tubos plásticos con tapa rosca de 50 mL y fueron incubadas con 5 mL de una solución de HCl 0.05 M conteniendo pepsina (5 mg/mL; Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.) y goma guar (5 mg/mL) durante 30 min en un baño de agua a 37°C con agitación horizontal. Posteriormente el pH se ajustó a 5,2 mediante la adición de 20 mL de un buffer acetato de sodio 0,1 M. Este buffer se preparó con 5,8 mL de ácido acético glacial añadido a 900 mL de agua destilada y el pH se ajustó a 5,2 mediante la adición de una solución de NaOH 1 M; luego, se agregaron 0,74 g de CaCl₂ y 0,2 g de NaN₃ ajustándose el volumen final a 1 L. Inmediatamente después de la adición del buffer a los tubos, se agregaron 5 mL de una mezcla enzimática conteniendo 0,93 g de pancreatina (Merck 107130, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 0,05 ml de amiloglucosidasa (Sigma A7095, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) y 3 mg de invertasa (Sigma I4504, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). Las incubaciones se realizaron durante 240 min en 2 corridas diferentes. Para caracterizar las velocidades de digestión del almidón se tomaron alícuotas de 0,25 mL de cada tubo a los 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 min después del inicio de la incubación, y se transfirieron a tubos plásticos de 15 mL con tapa rosca conteniendo 10 mL de etanol absoluto para detener la digestión. Luego, los tubos conteniendo las alícuotas y alcohol fueron centrifugados a 3000 *xg* durante 10 min y se determinó la glucosa en las alícuotas por colorimetría utilizando un

kit de glucosa oxidasa (Enzymatic Glycemia, Wiener Lab, Rosario, Argentina). Con los datos obtenidos de la incubación *in vitro* en los diferentes momentos se calculó un coeficiente de digestión *in vitro* del almidón para cada intervalo de tiempo (DC_t) como porcentaje del almidón total (AT) según Stevnebø et al. (2006):

$$(1) DC_t = (\text{cantidad de glucosa presente en el tiempo } t \times 0.9) / AT.$$

Además, se calcularon las áreas bajo la curva de digestión del almidón hasta los 180 min de incubación para obtener el índice de hidrólisis (HI), definido como la relación entre el área bajo la curva de cada muestra y el área correspondiente a una muestra de pan blanco (que se empleó como referencia). A partir del HI obtenido *in vitro*, se calculó un valor de índice glicémico predicho (IGp) para cada muestra, utilizando la ecuación reportada por Giuberti et al. (2012a):

$$(2) IGp = 1.013 \times HI$$

5.1.2.2. Producción de gas *in vitro* en el intestino grueso

Para simular la fermentación de los granos de sorgo en el intestino grueso de los cerdos se utilizó un procedimiento de producción de gas *in vitro*, donde se incuban muestras de alimentos con un medio de incubación en condiciones de anaerobiosis, y se inoculan con digesta o heces fluidas conteniendo microbiota intestinal activa proveniente de animales donantes. Las muestras de los granos de sorgo sometidos a los diferentes tratamientos fueron pre-digeridas con pepsina y pancreatina mediante un procedimiento enzimático de dos pasos según Cone et al. (2005). Para este procedimiento previo, las muestras se molieron a un tamaño de 1 mm, y 4 g se incubaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de una solución de HCl 0,1 M conteniendo 5 g/L de pepsina (Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) durante 1,5 h en baño de agua a 37°C. Luego, el pH se neutralizó con 20 mL de una solución de NaHCO_3 0.5 M, seguido de la incubación con 90 mL de una solución buffer fosfato 0,165 M conteniendo 2 g/L de pancreatina (Merck 107130, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 2 mL/L α -amilasa (ANKOM Technology Inc., Macedonia, NY) durante 1,5 h. Luego, el fluido se filtró con bolsas de tamaño de poro de 42 μm y las bolsas conteniendo los residuos de digestión fueron secadas a 55°C. La digestibilidad *in vitro* de la MS se determinó como la diferencia entre la MS incubada y la residual retenida en las bolsas. Posteriormente, el residuo de la pre-digestión *in vitro* de MS se utilizó para simular la cinética de fermentación en el colon mediante un proceso de producción de gas *in vitro*. Se colocaron muestras (0,5 g) de los granos de sorgo predigeridos en frascos de 100 mL, y se agregaron 0,5 mL de una solución de vitaminas/tampón fosfato (vitaminas y KH_2PO_4), 0,5 mL de una solución reductora ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y cisteína HCl), y 38 mL de una solución basal (conteniendo macro y microminerales, ácidos grasos de cadena corta y hemina). La composición de las soluciones fue la descrita por Williams et al. (2005). Luego de agregar las soluciones, se

hizo circular una corriente de CO₂ dentro de cada uno de los frascos, se cerraron con tapones de caucho butílico y se almacenaron a 4°C durante 8 h previo a la inoculación con el propósito de hidratar el sustrato. Luego, los frascos se atemperaron en baño de agua a 39°C durante 2 horas antes de ser inoculados. Para la inoculación se utilizó materia fecal fresca de 3 cerdas alimentadas con una dieta a base de sorgo. Las heces se pesaron y se diluyeron con una solución salina estéril en una relación peso:volumen de 1:5. El material diluido fue homogeneizado en un stomacher y se filtró a través de 4 capas de paño de queso. El fluido obtenido se gaseó continuamente con CO₂ y se agitó, para finalmente dispensarse en cada frasco de fermentación (<1 h entre la recolección de heces y la inoculación). Se incubaron un total de 88 botellas (4 tratamientos × 5 variedades de sorgo × 2 réplicas más 4 blancos) y el procedimiento se realizó en 2 corridas diferentes. La producción de gas se midió en los frascos a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48 y 72 h después de la inoculación. Para ello se utilizó un transductor conectado a un manómetro (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, EE.UU.), registrando las mediciones en unidades psi (libras por pulgada cuadrada). El volumen de gas se calculó a partir de la presión mediante una ecuación obtenida en un experimento previo como:

$$(3) \text{ volumen de gas (mL): } 3,9484 \times \text{Psi} + 0,2084 \times \text{Psi}^2 \text{ (R}^2 = 0,978)$$

Los volúmenes de gas obtenidos durante la fermentación referidos a la MS incubada y los datos de producción acumulada de gas se ajustaron al modelo (Groot et al., 1996):

$$(4) \text{ VAMS} = A/[1 + (C/t)B],$$

donde VAMS es el gas total producido (mL/g de MS pesada en el frasco), A es la producción asintótica de gas (mL/g), B es la característica de conmutación de la curva, C es el tiempo en el que la mitad de la producción asintótica de gas ha sido alcanzada (h) y t es el tiempo (h). También se calcularon la velocidad máxima de fermentación (R_{max}, mL/h) y el tiempo en el que ocurre (T_{max}, h) (Bauer et al., 2001):

$$(5) R_{\text{max}} = (A \times C^B) \times B \times [(T_{\text{max}}^{-(B-1)})] / [(1 + CB) \times (T_{\text{max}} - B)^2],$$

$$(6) T_{\text{max}} = C \times [(B - 1)/(B + 1)^{(1/B)}].$$

5.1.2.3. Análisis químicos

Para los análisis químicos (Cuadro 1), las muestras de sorgo se trituraron a un tamaño de 1 mm y se analizaron de acuerdo a los procedimientos descritos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). El contenido de MS se determinó secando a 105°C hasta peso constante, las cenizas por combustión a 600°C durante 2 h, la proteína bruta por el método Kjeldahl y el extracto etéreo mediante enjuague con éter de petróleo (métodos 934.01, 967.05, 954.01 y 920.39, respectivamente). El análisis de la fibra

detergente neutra (aFDN) se realizó según Mertens et al. (2002) utilizando alfa-amilasa termoestable y el resultado fue expresado incluyendo cenizas residuales, y la fibra detergente ácido (FDA) se analizó según el Método 973.18 de la AOAC (AOAC, 1997). Los taninos condensados se determinaron con el método butanol-HCl descrito por Makkar (2000). Los contenidos de almidón y amilosa se determinaron mediante hidrólisis enzimática utilizando kits comerciales (K-TSTA 07/11 y K-MYL, respectivamente, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Irlanda). El almidón de los granos de sorgo también fue caracterizado como almidón rápidamente digestible (ARD, g/kg MS), almidón lentamente digestible (ALD, g/kg MS) y almidón resistente (AR, g/kg MS) según (Englyst et al., 1992).

5.1.2.4. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados para confirmar que se cumplieran los supuestos del análisis de varianza (normalidad de datos, homocedasticidad, independencia de errores), utilizando el procedimiento PROC UNIVARIATE (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Los valores de DCT y de volumen de gas acumulado en cada intervalo específico de tiempo se consideraron dependientes del intervalo previo y se analizaron como medidas repetidas, utilizando el tiempo de incubación para la medida repetida. Luego, este parámetro se comparó entre tratamientos según el modelo:

$$(7) Y_{ijkl} = \mu + P_i + T_j + G_k (P \times T)_{ij} + e_{ijkl},$$

donde μ es la media del parámetro, P_i es el efecto fijo del tipo de procesamiento ($i = \text{SEC, GR, RGE y RGM}$), T_j es efecto fijo del tiempo ($j = 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, \text{ y } 240 \text{ min, o } 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 \text{ h}$), G_k es el efecto aleatorio del genotipo del grano ($k = 1, 2, 3, 4, 5$), $(P \times T)_{ij}$ es la interacción entre el tipo de procesamiento y el tiempo y e_{ijkl} es el error residual. Dado que los intervalos de tiempo no estaban espaciados uniformemente, se aplicó una estructura de covarianza (SP (POW)) para los residuos.

El resto de los datos (el coeficiente de digestión *in vitro* del almidón a los 240 min, extracto etéreo, contenido de almidón y amilosa, fracciones de almidón, HI, IGp , digestión *in vitro* de MS y parámetros de fermentación) se analizaron mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS según el modelo:

$$(8) Y_{ij} = \mu + P_i + G_j + e_{ij},$$

donde μ es la media del parámetro, P_i es el efecto fijo del tipo de procesamiento ($i = \text{SEC, GR, RGE y RGM}$), G_j es el efecto aleatorio de la muestra de grano de sorgo ($j = 1, 2, 3, 4, 5$) y e_{ij} es el error residual. Para la prueba de producción de gas *in vitro*, el efecto "corrida" se incluyó como un efecto aleatorio. Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey. Adicionalmente, se utilizó la correlación del Pearson mediante el

procedimiento PROC CORR de SAS para determinar relaciones entre el contenido de taninos condensados de los granos con parámetros de composición química y de digestión *in vitro*. La significación estadística se consideró en $P < 0,05$ y las tendencias en $P < 0,10$.

5.1.3. Resultados Experimento 1

5.1.3.1. Composición química de los granos de sorgo

El nivel de almidón de los granos de sorgo usados en este experimento estuvo en un rango entre 631 y 705 g/kg MS y fue afectado por los tratamientos (Cuadro 1). En los sorgos que fueron fermentados el nivel de almidón se redujo en promedio 9,4% y el contenido de taninos disminuyó en promedio 80,1% con respecto a los granos secos ($P < 0,001$). Además, el nivel de amilosa en los granos reconstituidos molidos (RGM) fue más alto que en los granos secos ($P = 0,024$).

Cuadro 1. Composición química^d (g/kg MS) y contenido de amilosa (g/100 g de almidón) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituidos y ensilados durante 21 d como grano entero (RGE) o molido (RGM).

	SEC	GR	RGE	RGM	EEM ^e	P-valor ^f
MS*	896 ^a	633 ^c	694 ^b	689 ^b	4,1	<0,01
MO*	986 ^a	986 ^a	985 ^b	984 ^c	0,7	<0,01
N*	13,4 ^b	13,0 ^{bc}	13,1 ^c	14,0 ^a	0,29	<0,01
aFDN*	119	105	133	102	13,1	0,09
FDA*	42,5	40,5	42,6	43,4	7,08	0,73
TC*	6,80 ^a	4,16 ^b	1,76 ^c	0,94 ^c	1,971	<0,01
EE	41,7	35,2	35,2	37,6	2,01	0,089
Almidón	705 ^a	676 ^b	646 ^{bc}	631 ^c	9,7	<0,001
Amilosa	28,3 ^b	31,2 ^{ab}	32,4 ^{ab}	34,9 ^a	2,12	0,024

^dMS, materia seca; MO, materia orgánica; N, nitrógeno; aFDN, fibra detergente neutra analizada con amilasa termoestable y expresada incluyendo cenizas residuales; FDA, fibra ácido detergente expresada incluyendo cenizas residuales; TC, taninos condensados; EE, extracto etéreo. ^eEEM, error estándar de las medias (n=5); ^fP, nivel de significancia del tratamiento. Letras diferentes en la misma fila son diferentes ($P < 0,05$). *Datos extraídos de Aguerre et al. (2015).

5.1.3.2. Perfil de digestión *in vitro* del almidón

Dado que a los 240 minutos de incubación no se alcanzó la meseta de digestión del almidón, y que al modelizar los datos de digestión en función del tiempo no se obtuvo un buen ajuste de los parámetros, decidimos comparar los datos entre tratamientos para cada tiempo de incubación. Los granos secos (SEC) y los remojados (GR) fueron menos digeridos que los granos reconstituidos y ensilados (RGE y RGM, $P < 0,01$; Figura 1). Además, los granos reconstituidos y ensilados molidos (RGM) fueron los que presentaron

una mayor y más rápida digestión del almidón ($DCt = 0,953$; $P < 0,001$) a lo largo de todo el período de incubación. Las diferencias entre tratamientos se observaron desde los primeros 20 minutos de incubación ($P < 0,001$) entre los granos SEC y GR, mientras que diferencias más considerables entre los granos que fueron fermentados (RGE y RGM) y los que no lo fueron se observaron desde el minuto 60 de incubación ($P < 0,01$).

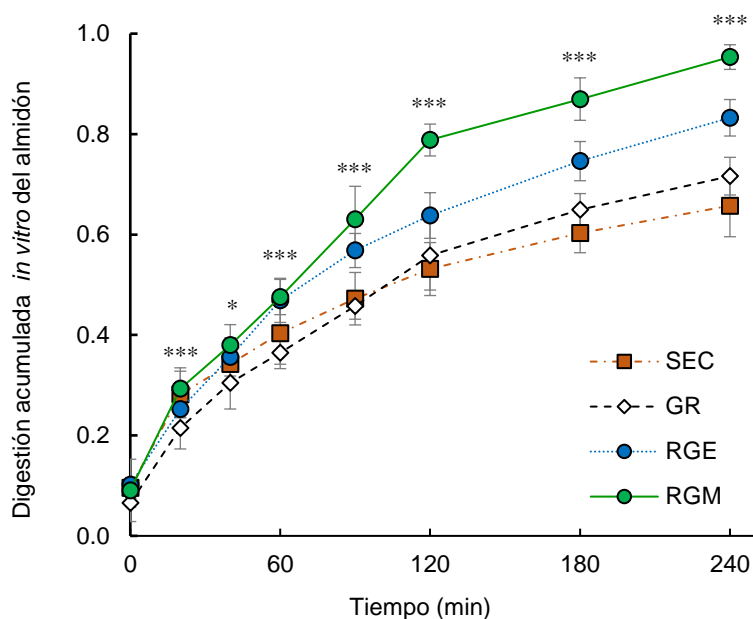


Figura 3. Cinética de la digestión acumulada *in vitro* de almidón (como fracción del almidón total) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados (GR) o reconstituidos y ensilados enteros (RGE) o molidos (RGM). Para cada punto de tiempo, los asteriscos indican al menos una diferencia significativa (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) entre tratamientos. Los valores son medias ($n = 5$, \pm d.e.).

Las fracciones de almidón fueron diferentes entre tratamientos ($P < 0,001$; Cuadro 2). Los granos secos mostraron el mayor contenido en almidón rápidamente digestible, mientras que el tratamiento donde los granos fueron remojados mostró un mayor contenido en almidón de digestión lenta. Además, los granos ensilados y molidos tuvieron el menor contenido de almidón resistente. Los valores de índice de hidrólisis (HI, 64,5 a 89,6; $P < 0,001$) y de índice predicho de glicemia (IGp , 65,3 a 90,8; $P < 0,001$) estuvieron afectados por los tratamientos. De esta forma, los granos sin tratar (SEC) y los remojados presentaron un valor de IGp promedio con respecto a otros cereales, mientras que los granos ensilados (RGE y RGM) mostraron valores altos para este parámetro ($IGp > 70$).

Cuadro 2. Coeficiente de digestión *in vitro* del almidón a 240 min de incubación (CDt₂₄₀), fracciones de almidón, índice de hidrólisis (IH) e índice glicémico predicho (IGp) de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituido y ensilado durante 21 días como granos enteros (RGE) o molidos (RGM).

	SEC	GR	RGE	RGM	EEM ^e	P-valor ^f
DCt ₂₄₀	0,657 ^d	0,716 ^c	0,833 ^b	0,953 ^a	0,0142	<0,001
ARD ^g	161 ^a	117 ^c	144 ^b	141 ^b	8,30	<0,001
ADL ^h	367 ^b	386 ^a	315 ^c	353 ^b	13,00	<0,001
AR ⁱ	177 ^a	172 ^a	187 ^a	137 ^b	14,53	<0,001
IH ^j	64,5 ^c	65,7 ^c	77,4 ^b	89,6 ^a	1,75	<0,001
IGp ^k	65,3 ^c	66,5 ^c	78,4 ^b	90,8 ^a	1,77	<0,001

^eError estándar de la media (n = 5). ^fNivel de significación del tratamiento; diferentes letras en la misma fila difieren (P<0,05). ^gAlmidón de rápida digestión (g/kg MS). ^hAlmidón de digestión lenta (g/kg MS). ⁱAlmidón resistente (g/kg MS). ^jCalculado utilizando pan blanco como referencia (IH = 100). ^kCalculado según Giuberti et al. (2012a).

5.1.3.2. Digestión *in vitro* de la MS y perfil de producción de gas

Se observaron diferencias de digestión *in vitro* (P = 0,005) en dos etapas de la MS (Cuadro 3) para los granos de sorgo sometidos a los diferentes tratamientos. Los granos que fueron digeridos en mayor magnitud fueron los del tratamiento RGM, mientras que los granos remojados y los RGE fueron digeridos en menor medida. Los volúmenes de gas producidos fueron similares entre tratamientos, pero los granos de RGM alcanzaron el tiempo medio de producción de gas asintótico más rápido (P<0,001) y la tasa máxima de producción de gas más alta (P = 0,015); estas diferencias fueron evidentes luego de 10 h de iniciada la incubación (P<0,01, Figura 2).

Cuadro 3. Parámetros de digestión y fermentación *in vitro* de la MS de granos de sorgo secos (SEC, control), remojados durante 24 h (GR), reconstituido y ensilado durante 21 días como granos enteros (RGE) o molidos (RGM).

	SEC	GR	RGE	RGM	EEM ^c	P-valor ^d
Digest IV de MS ^e	0,61 ^{ab}	0,57 ^b	0,58 ^b	0,63 ^a	0,119	0,005
VAMS (mL/g MS) ^f	254	258	235	255	15,4	0,232
A (mL/g MS) ^g	255	259	231	253	16,8	0,169
T _{1/2} (h) ^h	17,1 ^a	17,2 ^a	17,4 ^a	13,7 ^b	0,71	<0,001
R _{max} (h) ⁱ	8,53 ^{ab}	8,23 ^{ab}	6,74 ^b	10,31 ^a	2,342	0,022
T _{max} (mL/h) ^j	20,2 ^{ab}	20,4 ^{ab}	22,7 ^a	16,5 ^b	3,67	0,015

^cError estándar de la media (n = 5). ^dNivel de significación del tratamiento; diferentes letras en la misma fila difieren (P<0,05). ^eDigestión *in vitro* de la MS mediante incubación con pepsina-HCl y pancreatina (según Cone et al., 2005). ^fVolumen de gas acumulado. ^gA: producción asintótica de gas. ^hTiempo medio de la producción asintótica de gas. ⁱTasa máxima de producción de gas. ^jTiempo en que se produce la R_{max}.

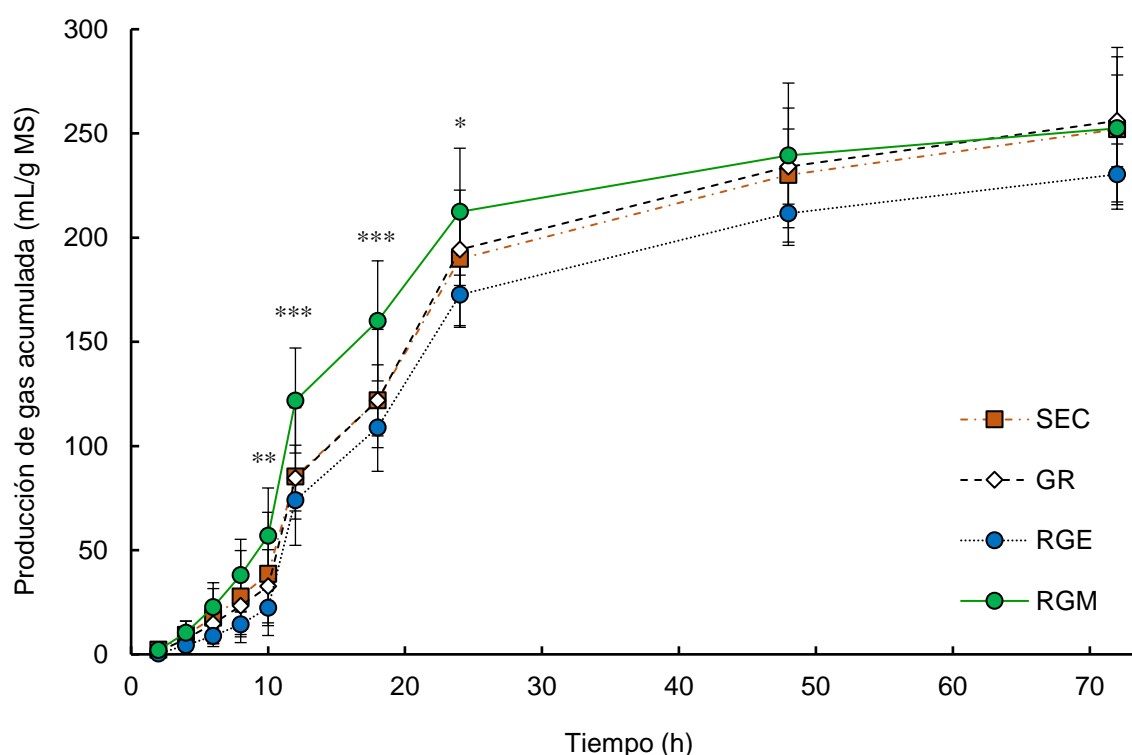


Figura 4. Cinética de producción de gas *in vitro* (mL/g MS incubada) de granos de sorgo secos (secos, control), remojados (SG) o reconstituidos y ensilados como enteros (EWG) o molidos (EGG) pre-digeridos e incubados con heces diluidas de cerdas. Para cada punto de tiempo, los asteriscos indican al menos una diferencia significativa (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001) entre tratamientos. Los valores son medias (n = 5, ± s.d.).

Cuadro 4. Correlación entre parámetros de composición química (g/kg MS) y de digestión *in vitro*, y contenido de taninos condensados de los granos de sorgo.

Variable	Par. Estad.	TC ^j
Almidón	r	0,219
Amilosa	r	-0,148
ARD ^a	r	-0,386
ADL ^b	r	-0,562**
AR ^c	r	0,541**
DCT ₂₄₀ ^d	r	-0,631**
IH ^e	r	-0,668***
IGp ^f	r	-0,668**
VAMS ^g	r	-0,157
R _{max} ^h	r	-0,340
T _{max} ⁱ	r	0,347

^aAlmidón de rápida digestión (g/kg MS). ^bAlmidón de digestión lenta (g/kg MS). ^cAlmidón resistente (g/kg MS). ^dCoefficiente de digestión *in vitro* del almidón a 240 min de incubación. ^eÍndice de hidrólisis. ^fÍndice glicémico predicho. ^gVolumen de gas acumulado (mL/g MS). ^hTasa máxima de producción de gas (mL/h). ⁱTiempo en que se produce la R_{max} (h). ^jTC, taninos condensados (g/kg MS). *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

No se observaron correlaciones entre los contenidos de taninos condensados y los de almidón y amilosa de los granos, pero el contenido de almidón de digestión lenta se correlacionó negativamente con el contenido de taninos (P<0,01), mientras que para el contenido de almidón resistente de los granos esta correlación fue positiva (P<0,01). Algunos parámetros *in vitro* relacionados con la digestión de los granos como DCT₂₄₀, IH y IGp se correlacionaron de forma negativa con el contenido de taninos de los granos (P<0,01).

5.2. Experimento 2

5.2.1. Introducción y objetivos

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio observamos que la reconstitución de granos de sorgo de diferentes genotipos provocó aumentos en la digestión *in vivo* e *in vitro* del almidón. Esto indica el efecto favorable de la fermentación del grano para facilitar el uso digestivo de sus nutrientes. En ambos estudios se realizaron aproximaciones que permitieron evaluar los granos en forma pura, y en su utilización tanto para rumiantes como para monogástricos. Sobre la base de estos trabajos, nos interesó evaluar si estos efectos observados en los granos de sorgo fermentados también podían ser detectados cuando los granos fueran cosechados con alta humedad y ensilados, y cuando se incluyeran en dietas completas para lechones. Nuestra hipótesis entonces fue que dietas completas que contienen granos de sorgo fermentados, mediante reconstitución de granos secos o ensilaje de granos húmedos, deberían asociarse con una mayor digestibilidad del almidón. Para probar esta hipótesis, evaluamos la utilización de los nutrientes, la velocidad de digestión del almidón y los productos de fermentación intestinal de dietas completas para lechones conteniendo granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados, o cosechados secos y reconstituidos, utilizando aproximaciones *in vivo* e *in vitro*.

5.2.2. Materiales y métodos

Para este estudio se realizó un protocolo experimental con lechones en post-destete para evaluar la utilización digestiva y metabólica de los nutrientes de dietas experimentales formuladas con granos de sorgo provenientes de un mismo cultivo. Además, se evaluó la digestibilidad del almidón y la fermentación en intestino grueso de las dietas experimentales utilizando aproximaciones *in vitro* que aportan información complementaria sobre las cinéticas de digestión de los nutrientes. De forma de clarificar la descripción de los procedimientos para el lector dividiremos el Experimento 2 en una sección que describe las metodologías con animales y otra sección que describe los métodos *in vitro*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de FVET, UdelaR (CEUAFVET-488). El experimento se realizó en el Instituto de Producción Animal de FVET (Departamento de San José, Uruguay; 34°41'S, 56°32'W).

5.2.2.1. Cultivo, cosecha y almacenaje de los granos de sorgo

Un cultivo de una variedad comercial de sorgo granífero (Flash 10, grano rojo, bajo en taninos, de IPB®, San José, Uruguay) fue dividido en 9 parcelas de 30 × 30 m de superficie cada una. Las parcelas fueron asignadas al azar para ser cosechadas en dos momentos diferentes: los granos de 3 parcelas se recolectaron en estado inmaduro y con un

contenido de humedad aproximado del 40%, mientras que los granos de las 6 parcelas restantes se recolectaron con el grano en etapa madura y con un contenido de humedad aproximado del 12%. Los granos cosechados con alto contenido de humedad fueron molidos a un tamaño de partícula de 3 mm en un molino (JF 2D, JF Máquinas Agrícolas Ltda, Itapira, SP, Brasil), compactados y almacenados en barriles plásticos de 200 L en condiciones anaeróbicas para que fermentaran. Los granos de 3 parcelas cosechadas con el grano maduro se molieron a un tamaño de partícula de 3 mm y se reconstituyeron. Para ello, se añadió agua suficiente para alcanzar un contenido de humedad del 40%, y se almacenaron inmediatamente en condiciones anaeróbicas en barriles de plástico de 200 L para que fermentaran. Los granos de las 3 parcelas restantes se almacenaron como grano seco entero en idénticos barriles plásticos. Los granos de cada una de las parcelas del cultivo original fueron almacenados en barriles diferentes para preservar el esquema de parcelas aleatorias previamente definido.

5.2.2.2. Procedimientos experimentales con animales

Para el estudio se utilizaron veintisiete lechones machos castrados, cruce de Landrace × Large White, con un peso vivo inicial de $8,60 \pm 1,88$ kg, provenientes de una granja comercial. Los lechones fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas ($0,9 \times 1,2$ m²) equipadas con comederos individuales, bebederos automáticos y piso de rejilla. Los animales fueron bloqueados por peso y se asignaron de forma aleatoria a una de tres dietas experimentales, que estuvieron compuestas básicamente por sorgo y harina de soja de la siguiente forma:

- 1) la dieta conteniendo granos de sorgo cosechados secos (SEC),
- 2) la dieta conteniendo granos de sorgo cosechados secos y reconstituidos (REC), y
- 3) la dieta conteniendo granos de sorgo cosechados húmedos y ensilados (ENS).

Los granos provinieron de las 9 parcelas descritas anteriormente. Las dietas se formularon siguiendo las recomendaciones propuestas por de Blas (2013) para lechones e incluían el mismo nivel de sorgo en base materia seca. Las dietas experimentales eran elaboradas dos veces por día para evitar el deterioro de los granos fermentados. Para eso, los barriles plásticos eran abiertos, se retiraba la cantidad de granos fermentados necesaria para la preparación, e inmediatamente se volvían a sellar. Los granos secos eran molidos a tamaño de partícula de 3 mm previo a la elaboración de la dieta SEC. Los ingredientes y composición química de las dietas experimentales se presentan en el Cuadro 4. Para mantener el diseño de parcelas al azar seguido en el cultivo, 3 animales recibieron dietas elaboradas con los granos recolectados de cada una de las parcelas. De esta forma, el experimento se basó en un diseño de bloques completos al azar, con 9 animales consumiendo cada dieta experimental y con 3 réplicas animales por cada una de las parcelas. La duración del experimento fue de 24 días en total, con 8 días de adaptación

a las condiciones experimentales y un período de mediciones de 16 días. Los animales tuvieron acceso libre a las dietas y a agua corriente durante todo el experimento.

Cuadro 5. Ingredientes y composición química de dietas experimentales.

	SEC	REC	ENS
<i>Ingredientes (g/kg MS)</i>			
Grano seco	619	-	-
Grano reconstituido	-	619	-
Grano ensilado	-	-	619
Plasma animal	44	44	44
Poroto de soja extruido	245	245	245
Aceite de soja	36	36	36
Fosfato monocálcico	13	13	13
Carbonato de calcio	10	10	10
Sal	17	17	17
Mix vitamínico-mineral ^a	5	5	5
L-Lisina	4,5	4,5	4,5
DL-Metionina	2	2	2
L-Treonina	3,5	3,5	3,5
Adsorbente de micotoxinas ^b	1	1	1
<i>Composición química analizada (g/kg MS)^c</i>			
Materia seca	897 ± 2,8	709 ± 16,8	693 ± 24,8
Cenizas	68,9 ± 3,32	74,3 ± 8,14	83,3 ± 7,00
Materia orgánica	931 ± 3,3	926 ± 8,1	917 ± 7,0
Proteína bruta	224 ± 20,2	218 ± 10,6	220 ± 14,6
Fibra detergente neutra	93,8 ± 13,30	84,8 ± 19,45	96,7 ± 15,42
Fibra detergente ácida	64,3 ± 8,59	62,8 ± 13,26	70,9 ± 11,33
Hemicelulosas	29,5 ± 6,10	22,0 ± 6,52	25,8 ± 9,57
Almidón	361 ± 14,8	370 ± 34,0	349 ± 20,4
Extracto etéreo	75,8 ± 3,60	79,2 ± 8,38	80,3 ± 9,34
Energía metabolizable, (kcal/kg) ^d	3711	3705	3596

^aSuministrado por kg de alimento: Vit. A: 34.000 IU; Vit. E: 204 IU; Vit D3: 6.800 IU; Vit. K: 15 mg; Tiamina (Vit. B1): 4,7 mg; Riboflavina (Vit. B2): 18,5 mg; Piridoxina (Vit. B6): 9,9 mg; Vit. B12: 0,10mg; Ácido pantoténico: 69,7 mg; Colina: 980 mg; Niacina: 146 mg; Ácido fólico: 1,6 mg; Biotina: 0,5 mg; Mn: 151 mg; Se: 1,3 mg; Cu: 50 mg; Fe: 403 mg; Zn: 390 mg; I: 4.7 mg. ^bFree-Tox, Nutrex, Bélgica. ^cLos datos son medias ± desviación estándar (n = 3). ^dCalculado de acuerdo a Noblet y Perez (1993).

El peso de los animales se registró cada 5 días, y el consumo de alimento se registró diariamente pesando la cantidad de alimento ofrecido y rechazado. La totalidad de las heces y orina excretada por cada lechón fue medida entre los días 8 y 13. Las heces fueron pesadas diariamente de forma individual, se registró el pH, la consistencia fecal y una alícuota diaria se conservó a -20°C hasta su análisis para determinar la digestibilidad aparente de los nutrientes. La orina fue colectada de forma continua en recipientes plásticos conteniendo 25 mL de una solución de HCl 6 N para prevenir la volatilización del N urinario, y diariamente se registró el volumen. El pH fecal se determinó con un pH metro digital (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapur) diluyendo 5 g de heces frescas en 50 mL de agua destilada. La consistencia fecal se puntuó usando una escala de 1 (heces firmes) a 4 (heces acuosas) como lo describen Freitas et al. (2006). A partir del día 19 de experimento se incluyó Cr₂O₃ (2,5 g/kg, según van Leeuwen et al., 1996) a las dietas como marcador indigestible para determinar la digestibilidad ileal del almidón. Los dos últimos días del experimento (día 23 y 24) los animales fueron insensibilizados mediante aturdimiento eléctrico y se sacrificaron mediante exanguinación siguiendo el orden de bloques y tratamientos. Para simplificar el proceso de manipulación y muestreo, la eutanasia se realizó a la mitad de los animales el día 23 y a la otra mitad el día 24. El proceso de colecta de muestras se realizó sobre un animal a la vez, y tuvo una duración media de 15 minutos. El tracto gastrointestinal de cada animal se extrajo inmediatamente después del sacrificio y los segmentos (estomago, duodeno, yeyuno-íleon, ciego y colon) se identificaron y ligaron antes de ser separados. Se tomaron muestras de la digesta del íleon, ciego y del colon medio para la medición del pH. Además, se colectó la totalidad del contenido del íleon de cada animal en tubos plásticos y se conservaron a -20°C, para determinar la digestibilidad ileal del almidón. Muestras individuales de la digesta del ciego y del colon fueron conservadas a -20°C en bolsas plásticas para la determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles en esos sectores del intestino grueso.

5.2.2.3. Estudio de las cinéticas de digestión del almidón y de fermentación en intestino grueso

En paralelo con el estudio de nutrición realizado sobre los animales se realizaron aproximaciones adicionales que simulan los procesos digestivos y que permitieron evaluar cinéticas de digestión en intestino delgado y cinéticas de fermentación en intestino grueso, de forma de obtener información complementaria sobre el uso o disponibilidad de los nutrientes a través del tiempo.

5.2.2.3.1. Digestión in vitro del almidón

Para caracterizar la digestión *in vitro* del almidón de los granos de sorgo cosechados y conservados secos, reconstituidos, ensilados con alta humedad y de las dietas experimentales se utilizó el mismo procedimiento descrito en el Experimento 1 (ver 4.1.2.1. Digestión *in vitro* del almidón) con algunas modificaciones. Al incubar las dietas

completas se decidió ampliar el tiempo de incubación hasta 480 min, ya que en algunas corridas del análisis no se alcanzó la meseta de digestión. Por lo tanto, para caracterizar las tasas de digestión del almidón en las dietas completas, tomamos alícuotas de cada tubo a los 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360 y 480 min después del inicio de la incubación. El coeficiente de digestión *in vitro* del almidón para cada intervalo de tiempo (DC_t), el índice de hidrólisis (IH) y el índice glucémico predicho (*IGp*) fueron calculados tal como se describió previamente en el Experimento 1.

5.2.2.3.2. Fermentación *in vitro*

Para simular la fermentación de las dietas experimentales en el intestino grueso de los cerdos, y empleando materia fecal de los lechones que estaban en experimentación como inóculo, se incubaron *in vitro* las dietas experimentales pre-digeridas siguiendo el procedimiento descrito en el Experimento 1 (5.1.2.2. Producción de gas *in vitro* en el intestino grueso) con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

Muestras de las dietas experimentales fueron pre-digeridas en dos etapas con soluciones conteniendo pepsina-HCl y pancreatina-amilasa (según Cone et al., 2005). Posteriormente, 0,2 g de las muestras pre-digeridas fueron pesadas en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad, y a cada frasco se agregaron 30 mL de un medio de incubación. La composición de este medio de incubación fue descrito por Poelaert et al. (2017). Luego de agregar el medio de incubación, se hizo circular una corriente de CO₂ dentro de cada uno de los frascos, se cerraron con tapones de caucho butílico y se almacenaron a 4°C durante 8 h con el propósito de hidratar el sustrato. Luego, los frascos se atemperaron en baño de agua a 39°C durante 2 horas antes de ser inoculados.

Para la inoculación, y a fin de que el inóculo y sustrato correspondieran, se incubaron las muestras pre-digeridas de las dietas experimentales formuladas con granos de sorgo provenientes de las 9 parcelas originales, que fueron inoculadas con heces de lechones del bloque correspondiente a esa parcela. Para la inoculación se empleó materia fecal de 1 lechón por bloque, con un total de 9 muestras de inóculo fecal diferentes. Las materias fecales fueron colectadas los días 13 y 14 del período experimental. De las heces de cada lechón muestreado, 15 g fueron diluidos en 75 mL del medio de incubación. El material diluido se homogeneizó en un stomacher (BagMixer® 400, Interscience International), el fluido obtenido se gaseó con CO₂ y se dispensaron 10 mL del inóculo obtenido en los frascos de fermentación, en un tiempo menor a 1 h entre la recolección fecal y la inoculación. Después de la inoculación de los frascos, los tapones de butilo se sujetaron con precintos de aluminio y permanecieron en el baño de agua durante todo el período de medición. Se incubaron un total de 72 frascos (9 frascos conteniendo dieta pre-digerida inoculada con la materia fecal correspondiente × 2 réplicas × 2 blancos), y el procedimiento se realizó en 2 corridas diferentes.

La producción de gas se midió en los frascos a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48 y 72 h después de la inoculación utilizando un transductor conectado a un manómetro (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, EE.UU.) y registrado en unidades psi (libras por pulgada cuadrada). El volumen de gas dentro de cada botella se calculó a partir de la presión medida usando una ecuación obtenida en un ensayo paralelo, como:

$$(9) \text{ volumen de gas (mL): } 5,2916 \times \text{Psi} - 0,7647 \text{ (R}^2 = 0,987\text{)}.$$

Los volúmenes de gas fueron ajustados al modelo propuesto por Groot et al. (1996), y se calculó la velocidad máxima de fermentación (R_{\max} , mL/h) y el tiempo en el que ocurre (T_{\max} , h) según Bauer et al. (2001) de la misma forma que fue previamente descrito. Además, por cada frasco incubado para medir producción de gas se incubaron cuatro réplicas, que después de 24 h y 72 h de fermentación fueron abiertas (2 por horario) deteniéndose la incubación. Se dispensaron 2 mL del contenido de estos frascos en microtubos, se centrifugaron a 13.000 \times g, durante 5 min a 4 ° C, y se almacenaron a -20 ° C hasta el análisis para la determinación del contenido de ácidos orgánicos.

5.2.2.4. Análisis de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos fueron determinados en las muestras provenientes de los frascos del procedimiento de fermentación *in vitro* luego de 24 y 72 h de incubación, y en las muestras de digesta del ciego y del colon de los lechones sacrificados los dos últimos días del experimento. Las muestras provenientes de los frascos de fermentación *in vitro* fueron descongeladas, centrifugadas a 9000 \times g a 2°C durante 20 min y colocadas en viales para determinación de los ácidos orgánicos. Las digestas del ciego y del colon fueron descongeladas, se tomaron 3 g que fueron homogeneizados en un Stomacher (Lab Blender 80, Tekmar Co., Cincinnati, EE.UU) durante 2 min en 30 mL de una solución de H₂SO₄ 0,15 mmol/L preparada con agua ultrapura, y 2 mL del sobrenadante fue centrifugado a 9000 \times g a 2°C durante 20 min, según Chen y Lifschitz (1989). Las muestras de digesta diluidas y centrifugadas se colocaron en viales y se analizaron para el contenido de ácidos grasos volátiles y lactato. Las concentraciones de lactato y de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ramificados (AGCR) se analizaron de acuerdo con Adams et al. (1984) mediante un sistema HPLC Dionex Ultimate® 3000 (Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un Acclaim Rezex Organic Acid H + (8%) y una columna de 7,8 x 300 mm ajustada a 210 nm y usando H₂SO₄ 3 mM como eluyente. Los AGCC totales y los AGCR se calcularon como concentraciones de acetato + propionato + butirato e isobutirato + isovalerato + valerato, respectivamente. En las muestras de digesta del ciego y colon se determinó el contenido de MS y la concentración de ácidos orgánicos se expresó como mmol/L de la fase líquida de la digesta, mientras que en las muestras provenientes del procedimiento de fermentación *in vitro* las concentraciones de lactato y ácidos grasos se expresaron como mmol/g de MO incubada en los frascos de fermentación.

5.2.2.6. Análisis químicos y cálculos

Las muestras diarias de heces fueron descongeladas, se secaron a 60°C hasta peso constante y se combinaron de forma proporcional de acuerdo a las cantidades colectadas dentro de los 5 días de medición para confeccionar una muestra compuesta individual, que fue posteriormente analizada. Las muestras diarias de orina fueron descongeladas y se combinaron de forma proporcional para confeccionar una muestra compuesta por animal para su posterior análisis. Las muestras de digesta del ileon se secaron en liofilizador (Omnitronics, SP Scientific, Warminster, PA) durante 48 h y se combinaron de forma de tener 3 repeticiones por tratamiento para su análisis. Las muestras secas de alimentos (sorgos y dietas completas) y heces se molieron a tamaño de 1 mm y fueron analizadas para cenizas, PB, EE con hidrólisis ácida, FDN y FDA, como fue previamente descrito (ver 4.1.2.3. Análisis químicos). El contenido de N también fue determinado en las muestras de orina. Además, se determinó el contenido de almidón total y fracciones de almidón en las muestras de sorgo y de dietas experimentales, mientras que sobre las muestras de digesta ileal seca se determinó el contenido de almidón total. En las muestras de granos de sorgo la extracción de prolaminas se realizó de acuerdo con Hamaker et al. (1995) utilizando t-butanol como agente precipitante, mientras que el contenido de taninos se analizó a través del método de butanol-HCl propuesto por Makkar (2000). El contenido de Cr₂O₃ en las muestras de las dietas experimentales y digesta ileal se analizó de acuerdo a Fenton y Fenton (1979).

El coeficiente de digestibilidad aparente del tracto digestivo total se calculó como:

$$(10) \text{ [nutriente ingerido (g/d) - nutriente eliminado en heces (g/d)] / nutriente ingerido (g/d).}$$

La retención de N se calculó como:

$$(11) \text{ N ingerido (g/d) - [N eliminado en orina (g/d) + N eliminado en heces (g/d)].}$$

La digestibilidad ileal del almidón se determinó según van Leeuwen et al. (1996):

$$(12) \text{ 1 - [N digesta (g/kg)/M digesta (g/kg)] \times [M alimento (g/kg)/N alimento (g/kg)],}$$

donde N digesta (g/kg) es el contenido del nutriente en la digesta, M digesta (g/kg) es el contenido del marcador en la digesta, M alimento (g/kg) es el contenido del marcador en el alimento y N alimento (g/kg) es el contenido del nutriente en el alimento.

5.2.2.7. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados para confirmar que se cumplieran los supuestos del análisis de varianza utilizando el procedimiento PROC UNIVARIATE (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC). Los datos de composición química, consumo, digestibilidad aparente del tracto total, balance de N, características fecales, parámetros de digestión *in vitro*, fracciones de almidón, IH, *IGp* y parámetros de fermentación *in vitro* fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED de SAS, según el modelo:

$$(13) Y_{ij} = \mu + G_i + P_j + e_{ij},$$

donde μ es el promedio del parámetro, G_i es el efecto fijo del tipo de procesamiento de grano ($i =$ seco, reconstituido o ensilado), P_j es el efecto aleatorio de la parcela ($j = 9$ parcelas, 3 para cada tipo de procesamiento de grano) y e_{ij} es el error residual. Las comparaciones entre medias se realizaron mediante contrastes ortogonales previamente planificados, para estudiar los efectos del tipo de procesamiento del grano (C1 = granos secos vs. granos fermentados), y los métodos de procesamiento entre ellos (C2 = granos reconstituidos vs. granos cosechados temprano y ensilados).

Los datos del contenido de MS y de ácidos orgánicos en las digestas del ciego y del colon se compararon entre tratamientos según el modelo:

$$(14) Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + D_k + (T \times D)_{ik} + e_{ijk}$$

donde μ es el promedio del parámetro, T_i es el efecto fijo de la dieta formulada con granos de sorgo sometidos a diferentes tipos de procesamiento ($i =$ seco, reconstituido o ensilado), P_j es el efecto aleatorio de la parcela ($j = 9$ parcelas, 3 para cada tipo de procesamiento de grano), D_k es el efecto fijo del tipo de digesta analizada ($k =$ ciego o colon) y e_{ijk} es el error residual. Para estos parámetros las comparaciones entre medias se realizaron mediante la prueba de Tukey.

Las cinéticas de digestión *in vitro* del almidón y de fermentación se analizaron utilizando el procedimiento MIXED de SAS. Los valores de DCt y volumen de gas acumulado en cada momento específico se consideraron dependientes del tiempo anterior y se analizaron como medidas repetidas, utilizando el tiempo de incubación o el frasco como unidad para la medida repetida. Luego, se compararon estos parámetros entre tratamientos según el modelo:

$$(15) Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + T_k + (G \times T)_{ij} + e_{ijkl}$$

donde μ es el promedio del parámetro, G_i es el efecto fijo del tipo de procesamiento de grano ($i =$ seco, reconstituido o ensilado), P_j es el efecto aleatorio de la parcela ($j = 9$ parcelas, 3 para cada tipo de procesamiento de grano), T_k es el efecto fijo del tiempo ($k = 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360$ y 480 min, o $2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72$ h), ($G \times$

T_{ij} es la interacción entre el tipo de procesamiento del grano y el tiempo y e_{ijkl} es el error residual. Como los intervalos de tiempo no estaban espaciados uniformemente, se aplicó una estructura de covarianza (SP (POW)) para los residuos. Se utilizó el mismo modelo para analizar la producción de AGCC y AGCR después de 24 y 72 h de fermentación, y las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey. Cuando las interacciones fueron significativas, los efectos simples se analizaron utilizando la opción "SLICE" de SAS. Para todos los datos, la significación estadística se consideró en $P < 0,05$ y las tendencias en $P < 0,10$.

5.2.3. Resultados del Experimento 2

5.2.3.1. Composición química de los granos de sorgo

Al analizar la composición química de los granos de sorgo (Cuadro 5), observamos que, tal cual se esperaba, el nivel de humedad de los granos fermentados fue similar entre sí y mayor que en los granos secos ($P < 0,001$). Los granos ensilados presentaron un nivel de EE y valores de pH más bajos que los granos reconstituidos ($P = 0,006$). Las concentraciones de kafirinas fueron más altas en los granos ensilados que en los secos y en los reconstituidos ($P = 0,037$). Los niveles de taninos condensados fueron bajos en todos los granos, aunque los menores niveles se registraron en los secos ($P = 0,049$). El contenido de almidón fue más alto en los granos secos que en los reconstituidos y ensilados ($P = 0,003$), y a su vez, los granos reconstituidos tuvieron un mayor contenido de almidón que los granos cosechados con alta humedad y ensilados ($P = 0,024$). Además, el contenido de amilosa en los granos reconstituidos fue menor que en los ensilados ($P = 0,001$). Las fracciones de almidón de los granos se vieron afectadas por los tratamientos, ya que los granos secos tuvieron niveles más altos de almidón de rápida digestión y de almidón resistente, y niveles más bajos de almidón de digestión lenta ($P < 0,001$) que los demás. Los granos tratados presentaron niveles más altos de IH y IGp , y coeficientes de digestión *in vitro* de almidón más altos a los 240 min de incubación que los granos secos ($P < 0,05$). Como se esperaba, el nivel de humedad de los granos de sorgo afectó el contenido de humedad de las dietas experimentales (Cuadro 4). Sin embargo, no se observaron diferencias en el resto de las fracciones de composición química entre las tres dietas experimentales, incluso en el nivel de almidón ($P > 0,05$).

Cuadro 6. Composición química, contenido de amilosa, pH, fracciones de almidón, índice de hidrólisis, índice predicho de glicemia y digestibilidad *in vitro* del almidón de granos de sorgo secos, reconstituidos y ensilados.

	Tipo de procesamiento ^a			EEM ^b	Contrastes ^c (P)	
	Secos	Reconst.	Ensilados		C1	C2
<i>Composición química, g/kg MS</i>						
Materia seca	888	597	582	8,8	<0,001	0,335
Cenizas	20,8	21,2	27,2	2,36	0,260	0,094
Materia orgánica	979	979	973	3,7	0,478	0,299
Proteína bruta	128	126	124	2,0	0,308	0,562
Fibra detergente neutra	140	122	137	11,0	0,456	0,353
Fibra detergente ácida	77,7	66,8	75,4	6,00	0,386	0,329
Hemicelulosas	62,5	55,6	61,9	5,86	0,608	0,455
Extracto etéreo	38,2	41,3	36,7	1,03	0,547	0,006
Kafirinas	33,5	32,9	45,2	3,79	0,248	0,037
Kafirinas, % de PB	26,2	26,0	36,1	2,77	0,163	0,019
Taninos condensados	0,12	0,20	0,35	0,058	0,049	0,098
Almidón	614	586	553	12,8	0,003	0,024
Amilosa, g/100 g almidón	24,0	20,1	24,5	0,73	0,079	0,001
pH	-	4,01	3,91	0,021	-	0,006
<i>Fracciones de almidón</i>						
ARD ^d	129	56,2	30,5	9,90	<0,001	0,086
ALD ^e	195	348	351	19,3	<0,001	0,940
AR ^f	289	181	172	20,1	<0,001	0,735
IH ^g	65,1	74,3	69,4	2,30	0,029	0,150
IGp ^h	65,9	75,3	70,3	2,33	0,029	0,150
DCt ₂₄₀ ⁱ	0,712	0,836	0,878	0,0278	0,001	0,297

^aSecos: granos de sorgo cosechados maduros y almacenados como granos enteros secos; Reconst.: granos de sorgo cosechados maduros, molidos y reconstituidos; Ensilados: granos recolectados en estado inmaduro, molidos y ensilados. ^bError estándar de la media (n = 3). ^cContrastes: C1 = Granos secos vs. fermentados (Reconst. + Ensilados); C2 = Reconst. vs. Ensilados. ^dAlmidón rápidamente digestible (g/kg MS). ^eAlmidón lentamente digestible (g/kg MS). ^fAlmidón resistente (g/kg MS). ^gÍndice de hidrólisis, calculado tomando como referencia pan blanco (IH = 100). ^hÍndice predicho de glicemia, calculado según Giuberti et al. (2012a). ⁱCoefficiente de digestión *in vitro* del almidón a los 240 min de incubación (DCt₂₄₀).

5.2.3.2. Fracciones de almidón y perfil de digestión *in vitro* de almidón de las dietas experimentales

Las dietas experimentales (Cuadro 6) presentaron contenidos similares de almidón total, ARD y ALD, pero el nivel de almidón resistente fue mayor en la dieta que contenía granos

secos ($P = 0,008$). Además, los niveles de IH y *IGp* fueron similares entre tratamientos, presentaron valores relativamente altos (en promedio 74,1 y 75,1 respectivamente), y solo detectamos que estos parámetros tendían a ser más bajos en la dieta ENS que en la dieta REC. Cuando incubamos las dietas experimentales para evaluar la digestibilidad *in vitro* del almidón decidimos extender el período de incubación a 480 min. En cualquier caso, como el modelo de digestión del almidón no generó parámetros satisfactorios, decidimos presentar el valor máximo de digestión a 480 min, además de 240 min como hicimos para los granos de sorgo. La digestibilidad *in vitro* del almidón medida hasta 240 min fue similar entre dietas, pero observamos que la digestibilidad después de 480 min de incubación fue mayor en la dieta SEC que en las dietas que contienen granos fermentados ($P = 0,002$). Si bien las curvas de digestión presentaron formas similares (Figura 5), a lo largo de todo el período de incubación detectamos diferencias desde el minuto 20, lo que sugiere que la dieta SEC tuvo una mayor tasa de digestión al inicio de la incubación, para finalmente diferenciarse de las otras dos dietas después de 360 min.

Cuadro 7. Fracciones de almidón (g/kg MS), índice de hidrólisis (IH), índice glucémico predicho (*IGp*) y coeficiente de digestión *in vitro* del almidón (DCT) a los 240 y 480 min de incubación de las dietas experimentales.

	Tratamiento ^a			SEM ^b	Contrastes (P) ^c	
	SEC	REC	ENS		C1	C2
Almidón	361	370	349	10,8	0,876	0,189
ARD ^d	53,3	40,8	53,2	8,69	0,559	0,327
ALD ^e	201	249	217	15,7	0,111	0,162
AR ^f	107	79,6	78,8	7,49	0,008	0,946
IH ^g	76,7	76,9	68,8	3,12	0,326	0,086
<i>IGp</i> ^h	77,7	77,9	69,7	3,17	0,326	0,086
DCT ₂₄₀ ⁱ	0,854	0,843	0,792	0,0240	0,243	0,153
DCT ₄₈₀ ^j	0,942	0,876	0,829	0,0195	0,002	0,110

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media ($n = 3/\text{tratamiento}$). ^cContraste: C1 = SEC vs. dietas incluyendo granos fermentados (reconstituidos + ensilados); C2 = REC vs. ENS. ^dAlmidón rápidamente digestible. ^eAlmidón lentamente digestible. ^fAlmidón resistente. ^gÍndice de hidrólisis, calculado tomando como referencia pan blanco (IH = 100). ^hÍndice predicho de glicemia, calculado según Giuberti et al. (2012a). ⁱCoficiente de digestión *in vitro* del almidón a los 240 min de incubación (DCT₂₄₀). ^jCoficiente de digestión *in vitro* del almidón a los 480 min de incubación (DCT₄₈₀).

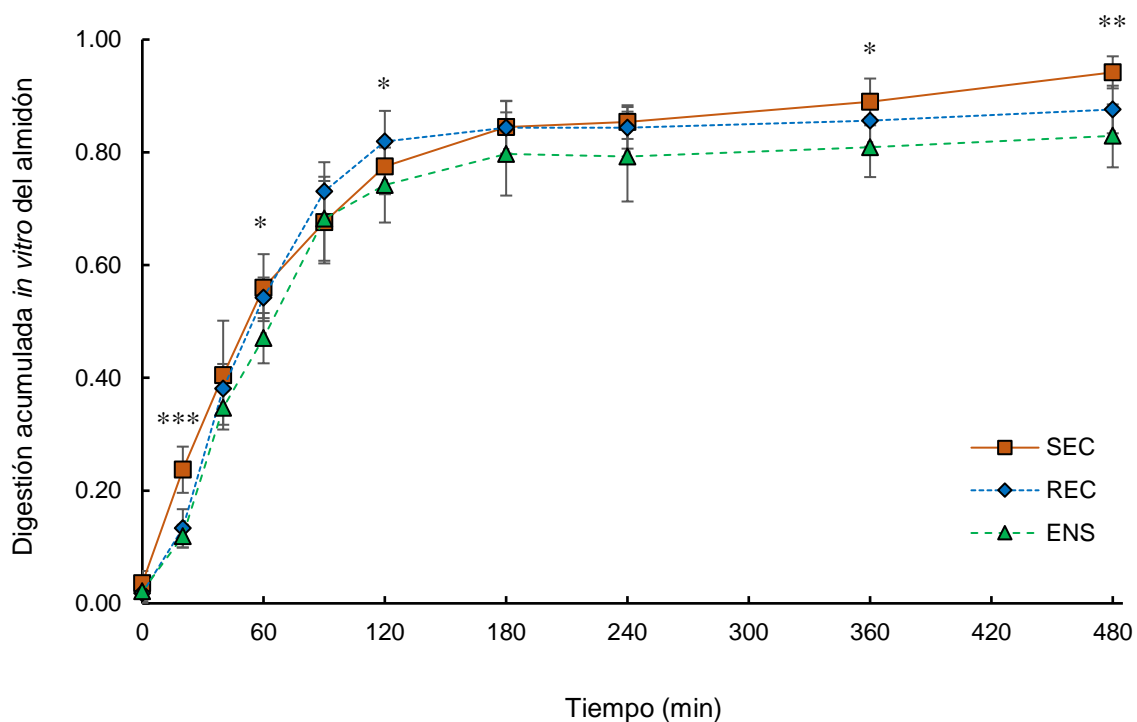


Figura 5. Cinética de la digestión acumulada de almidón (como fracción del almidón total) de las dietas experimentales. SEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. Para cada punto de tiempo, los asteriscos indican al menos una diferencia significativa (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) entre tratamientos. Los valores son medias ($n = 3$, \pm s.d.).

5.2.3.3. Consumo de alimento, rendimiento y digestibilidad de los nutrientes

Los animales se mantuvieron saludables y no se registraron muertes durante el curso del experimento. Al analizar los consumos relativos al peso vivo, los animales alimentados con dietas conteniendo granos secos (SEC) consumieron mayor cantidad que los que recibieron dietas con granos fermentados ($P = 0,003$; Cuadro 7), y entre estos dos grupos, lo que recibieron ENS consumieron más que los alimentados con REC ($P = 0,021$). Las ganancias diarias de peso fueron similares entre tratamientos, por lo que el índice de conversión fue más bajo en los grupos que recibieron REC y ENS ($P < 0,001$). Por otra parte, la digestibilidad aparente de la PB tendió a ser menor en la dieta ENS que en la dieta REC ($P = 0,051$), y la dieta SEC presentó una mayor digestibilidad de la FND, FAD y hemicelulosas que las dietas conteniendo granos fermentados ($P < 0,05$). La digestibilidad aparente del almidón medida en el íleon fue similar entre las tres dietas.

Cuadro 8. Consumo de alimento, ganancia diaria, índice de conversión, digestibilidad aparente de nutrientes en el tracto total y digestibilidad ileal aparente del almidón en lechones alimentados con las dietas experimentales.

	Tratamiento ^a				Contrastes (P) ^c	
	SEC	REC	ENS	EEM ^b	C1	C2
Consumo, g DM/d	1128	913	1106	72,0	0,189	0,070
Consumo, g DM/kg PV	73,1	57,4	67,0	2,74	0,003	0,021
Ganancia diaria, g	548	585	645	35,0	0,132	0,238
Índice de conversión, g/g ^d	2,09	1,56	1,71	0,088	<0,001	0,236
<i>Digestibilidad aparente del tracto total</i>						
Materia seca	0,895	0,887	0,846	0,016	0,193	0,118
Materia orgánica	0,894	0,896	0,854	0,016	0,390	0,119
Proteína bruta	0,858	0,863	0,811	0,015	0,285	0,051
Fibra detergente neutra	0,720	0,552	0,471	0,036	0,003	0,147
Fibra detergente ácida	0,701	0,538	0,467	0,043	0,010	0,265
Hemicelulosas	0,766	0,563	0,470	0,058	0,013	0,296
Extracto etéreo	0,866	0,850	0,807	0,024	0,251	0,246
<i>Digestibilidad aparente ileal^e</i>						
Almidón	0,940	0,941	0,957	0,007	0,362	0,179

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media (n = 9/tratamiento). ^cContrastes: C1 = SEC vs, dietas incluyendo granos fermentados (reconstituidos + ensilados); C2 = REC vs, ENS. ^dRelación entre el consumo de alimento y la ganancia diaria de peso (1 a 24 d). ^eLos valores son medias de muestras agrupadas del contenido de digesta ileal de 3 animales por grupo.

5.2.3.4. Balance de nitrógeno

Con respecto a los parámetros de consumo y excreción de N (Cuadro 8), si bien los consumos de N fueron similares entre tratamientos para el período de medición considerado (5 días), la excreción fecal de N fue mayor (P = 0,035) y la relación entre el N eliminado en heces y el N consumido tendió a ser mayor (P = 0,053) en los lechones que recibieron la dieta ENS con respecto a los que recibieron REC. Además, la relación entre el N eliminado en orina y el N consumido tendió a ser menor en los lechones alimentados con las dietas conteniendo granos secos (P = 0,054). No obstante, el N retenido y la relación entre el N retenido y el consumido fueron similares entre tratamientos.

Cuadro 9. Consumo, excreción y retención de N en lechones alimentados con las dietas experimentales.

	Tratamiento ^a				Contrastes (P) ^c	
	SEC	REC	ENS	EEM ^b	C1	C2
N ingerido (g/d)	34,17	28,72	34,28	3,195	0,362	0,110
N fecal (g/d)	4,86	3,66	6,35	0,780	0,872	0,035
N fecal (g/g N ingerido)	0,14	0,13	0,18	0,016	0,433	0,053
N urinario (g/d)	3,38	3,75	3,80	0,414	0,195	0,890
N urinario/N ingerido (g/g)	0,10	0,13	0,11	0,009	0,054	0,166
N retenido (g/d)	25,94	21,31	24,14	2,460	0,194	0,317
N retenido/N ingerido (g/g)	0,76	0,74	0,70	0,018	0,112	0,180

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados, ^bError estándar de la media (n = 9/tratamiento). ^cContrastes: C1 = SEC vs, dietas incluyendo granos fermentados (reconstituidos + ensilados); C2 = REC vs, ENS.

5.2.3.5. Parámetros fecales y de la digesta.

Los lechones alimentados con la dieta ENS eliminaron mayor cantidad de heces por día (P = 0,050) y la excreción fecal diaria expresada como g de MS tendió a ser mayor (P = 0,056) en este grupo que en los lechones que recibieron la dieta conteniendo granos reconstituidos (Cuadro 9). La consistencia fecal fue similar entre tratamientos, al igual que los valores de pH registrados en las digestas de íleon, ciego, colon medio y heces. Al comparar entre sí los distintos puntos donde medimos el pH, se observó que los valores de pH registrados en ciego y colon fueron similares entre sí (P = 0,635) independientemente de la dieta (P de interacción tratamiento × sitio de medición = 0,660), pero fueron más bajos que los registrados en íleon y en heces (P<0,0001). Además, los valores de pH registrados en el íleon fueron mayores a los registrados en las heces (media de pH en íleon = 6,60 vs. media de pH en heces = 6,18; P<0,0001).

Cuadro 10. Características fecales, y pH en digesta y heces en lechones alimentados con las dietas experimentales.

	Tratamiento ^a			EEM ^b	Contrastes (P) ^c	
	SEC	REC	ENS		C1	C2
Excreción fecal, g/d	579	566	756	77,0	0,268	0,050
Excreción fecal, g DM/d	172	153	204	20,5	0,738	0,056
MS en heces, %	31,1	27,6	28,8	2,06	0,151	0,556
Consistencia fecal ^d	2,44	2,23	2,27	0,223	0,385	0,881
pH íleon	6,06	6,52	6,44	0,281	0,154	0,795
pH ciego	5,67	5,88	5,67	0,086	0,307	0,103
pH colon	5,73	5,87	5,73	0,060	0,363	0,100
pH fecal	6,07	6,30	6,26	0,095	0,117	0,812

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media (n = 9/tratamiento). ^cContrastes: C1 = SEC vs, dietas incluyendo granos fermentados (reconstituidos + ensilados); C2 = REC vs, ENS. ^dConsistencia fecal: 1 (heces firmes) a 4 (heces acuosas).

5.2.3.6. Parámetros de fermentación *in vitro* de las dietas experimentales

Al pre-digerir las dietas usando el procedimiento en dos pasos con pepsina/HCl + pancreatina/amilasa (Cuadro 11) observamos que la digestibilidad *in vitro* de la MS en las dietas que contenían granos fermentados fue 25% mayor que en la dieta SEC (P = 0,001). Además, los volúmenes de gas producidos fueron diferentes entre tratamientos, observándose un mayor volumen de gas en la dieta experimental SEC que en las que contuvieron granos fermentados (P<0,001). Entre estas últimas, la dieta ENS presentó un menor volumen de gas que REC (P = 0,006). Además, la dieta SEC tardó más en alcanzar el tiempo medio de producción asintótica de gas (P<0,001), tuvo una tasa máxima de producción de gas más baja (P = 0,002) y tardó más en alcanzarla (P = 0,001) que la dietas que contenían granos fermentados. Estas diferencias fueron evidentes a partir de 4 h de iniciada la incubación (P<0,05, Figura 6).

Cuadro 11. Digestión *in vitro* de la MO y parámetros de fermentación de las dietas experimentales incubadas con heces de los lechones alimentados con las mismas dietas.

	Tratamiento ^a			SEM ^b	Contrastes (P) ^c	
	SEC	REC	ENS		C1	C2
Digest IV de la MO ^d	46,75	59,03	57,97	1,257	0,001	0,571
VAMO (mL/g MO) ^e	260,1	231,9	200,0	11,65	<0,001	0,006
A (mL/g MO) ^f	289,4	249,0	211,5	13,88	<0,001	0,004
T _{1/2} (h) ^g	12,4	8,2	6,8	1,61	<0,001	0,140
R _{max} (mL/h) ^h	14,0	18,7	18,3	0,98	0,002	0,821
T _{max} (h) ⁱ	3,4	2,0	1,5	0,38	0,001	0,397

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media (n = 3/tratamiento). ^cContrastes: C1 = SEC vs. dietas incluyendo granos fermentados (reconstituidos + ensilados); C2 = REC vs. ENS. ^dDigestión *in vitro* de la MO mediante incubación con pepsina-HCl y pancreatina (según Cone et al., 2005). ^eVolumen de gas acumulado. ^fProducción asintótica de gas. ^gTiempo medio de la producción asintótica de gas. ^hTasa máxima de producción de gas. ⁱTiempo en que se produce la R_{max}.

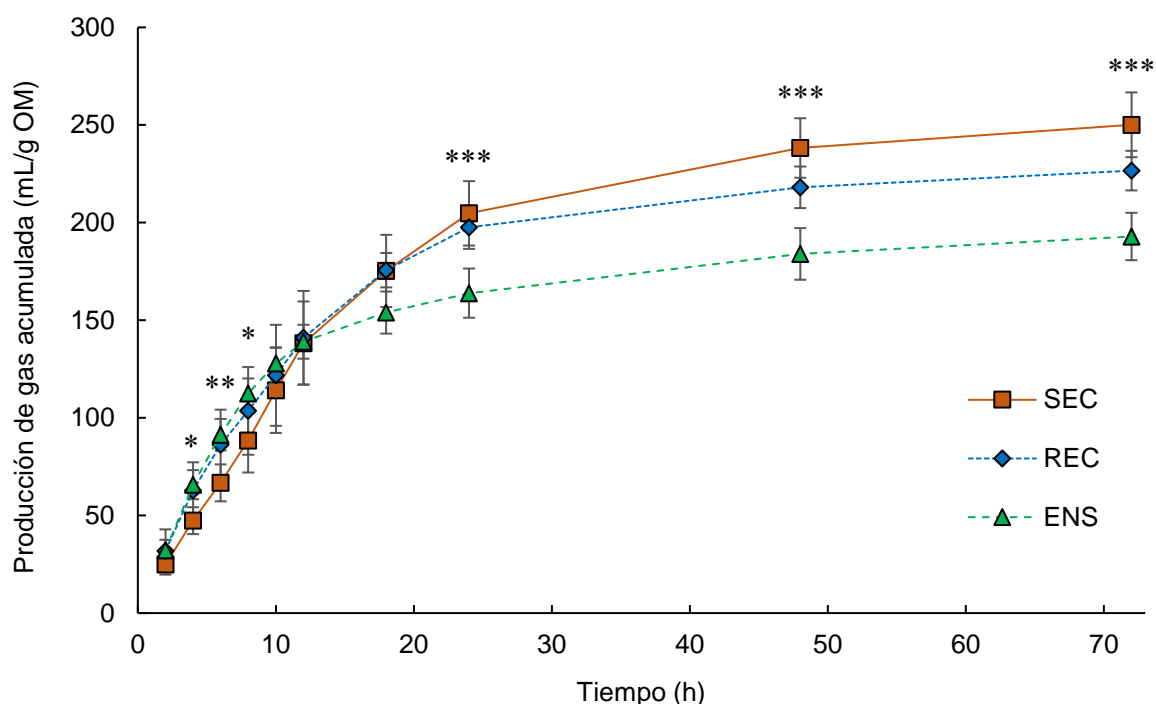


Figura 6. Cinética de producción de gas *in vitro* (mL/g MO incubada) para dietas formuladas con granos de sorgo secos (DRY), reconstituidos (REC) o cosechados con alta humedad y ensilados (ENS) pre-digeridos e incubados con heces diluidas de lechones alimentados con las mismas dietas incubadas. Para cada punto de tiempo, los asteriscos indican al menos una diferencia significativa (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001) entre tratamientos. Los valores son medias (n = 3, ± s.d.).

5.2.3.7. Producción de ácidos orgánicos durante la fermentación *in vitro*

La producción de ácidos grasos de cadena corta y de cadena ramificada medidos en los frascos de fermentación *in vitro* difirió entre tratamientos y tiempos de incubación. Para algunos ácidos grasos se observó una interacción entre el tipo de dieta y el tiempo de medición (Cuadro 11). La producción de acetato fue mayor en el tratamiento ENS que en los demás únicamente a las 24 h de incubación (slice P = 0,042). Al mismo tiempo, las cantidades de propionato, isovalerato, AGCC totales y AGCR registradas a las 72 h de fermentación fueron mayores en el tratamiento SEC que en los otros dos (Trat × hora, P<0,01). Los niveles de butirato fueron más bajos a las 24 que a las 72 h, siendo menores en el tratamiento REC que en los otros (P = 0,001), y en el mismo sentido, REC presentó menores proporciones molares de butirato que los tratamientos SEC y ENS (P<0,001).

Cuadro 12. Producción de lactato, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) y proporciones molares (%) de acetato, propionato y butirato de dietas experimentales pre-digeridas incubadas *in vitro* durante 24 o 72 h con heces de lechones alimentados con las dietas experimentales.

	Tratamiento ^a						EEM ^b	P ^c		
	SEC		REC		ENS			T	H	T×H
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h				
<i>mmol/g MO incubada</i>										
Lactato	0,90	1,29	1,41	1,31	1,75	1,52	0,304	0,222	0,932	0,552
Acetato	131 ^y	175	139 ^y	168	158 ^x	167	10,6	0,148	<0,001	0,004
Propionato	71,7	91,3 ^x	71,3	78,5 ^y	70,6	75,1 ^y	2,46	0,001	<0,001	0,004
Butirato	32,4	42,1	25,9	30,7	33,1	33,9	4,05	0,001	0,012	0,183
Isobutirato	3,33 ^y	5,34	2,95 ^y	4,42	5,25 ^x	4,51	0,512	0,062	0,027	0,019
Valerato	10,4	16,6	11,4	10,6	8,12	8,98	2,02	0,059	0,216	0,184
Isovalerato	7,39	12,9 ^x	6,74	9,68 ^y	7,93	9,48 ^y	2,04	0,014	<0,001	0,018
AGCC total	235	309 ^x	236	277 ^y	262	276 ^y	16,0	0,125	<0,001	0,002
AGCR	21,2	39,9 ^x	21,3	24,8 ^y	21,7	23,1 ^y	3,16	0,048	0,004	0,036
<i>Proporción molar (%)</i>										
Acetato	55,8	56,9	58,8	60,5	60,2	60,5	0,88	<0,001	0,136	0,669
Propionato	30,8	29,7	30,3	28,6	27,0	27,2	1,23	<0,001	0,076	0,270
Butirato	13,4	13,5	10,9	10,9	12,6	12,3	0,89	<0,001	0,883	0,954

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media (n = 3/tratamiento). ^cNivel de significancia de los efectos tratamiento (T), hora (H) e interacción tratamiento por hora (T×H). ^{x,y}Dentro de una fila, diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05).

5.2.3.8. Producción de ácidos orgánicos en el intestino grueso.

Los contenidos de MS de las digestas y los productos finales de fermentación en el intestino grueso de los lechones se presentan en el Cuadro 12. El contenido de MS de la digesta en ciego y en colon difirió entre tratamientos, y fue mayor en la digesta de los lechones alimentados con la dieta SEC ($P = 0,008$). Además, la digesta de los lechones alimentados con ENS tendió a tener la concentración más baja de propionato ($P = 0,087$). La digesta de los que recibieron REC tendió a presentar una menor concentración de butirato ($P = 0,055$), presentó menores concentraciones de isovalerato ($P = 0,016$), menores contenidos de AGCR ($P < 0,001$) y proporciones molares de butirato más bajas ($P = 0,041$) que los que recibieron las demás dietas.

Cuadro 13. Contenido de MS de la digesta (%), concentraciones de lactato, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) y proporciones molares de acetato, propionato y butirato en el ciego y colon de lechones alimentados con las dietas experimentales.

	Tratamientos ^a						SEM	P ^c		
	Ciego			Colon				T	D	T×D
	SEC	REC	ENS	SEC	REC	ENS				
MS (%)	12,8	10,3	8,81	13,2	10,1	10,1	0,67	0,008	0,301	0,409
<i>mmol/L de fase líquida de la digesta</i>										
Lactato	15,4	9,72	11,3	7,69	10,5	8,98	4,75	0,948	0,390	0,618
Acetato	213	236	245	209	242	216	14,9	0,284	0,431	0,451
Propionato	112	114	87,5	107	106	87,2	8,13	0,087	0,376	0,823
Butirato	63,2	42,5	58,8	65,1	40,8	56,7	6,28	0,055	0,875	0,904
Isovalerato	26,4	39,6	13,5	35,8	42,0	19,2	8,29	0,016	0,378	0,907
Valerato	43,4	45,8	30,1	45,7	39,5	29,9	9,88	0,439	0,696	0,609
AGCC totales	388	393	391	381	388	360	21,1	0,744	0,381	0,746
AGCR	69,8	85,4	43,7	81,5	81,5	46,7	10,61	<0,001	0,652	0,728
<i>Proporciones molares (%)</i>										
Acetato	54,3	60,5	62,7	55,6	62,6	57,4	3,04	0,234	0,744	0,247
Propionato	29,0	28,8	22,5	27,9	26,9	26,0	2,17	0,274	0,916	0,231
Butirato	16,6	10,7	14,8	16,5	10,5	16,6	1,55	0,041	0,581	0,604

^aSEC = dieta formulada con granos de sorgo secos; REC = dieta formulada con granos de sorgo reconstituidos; ENS = dieta formulada con granos de sorgo cosechados con alta humedad y ensilados. ^bError estándar de la media ($n = 9/\text{tratamiento}$). ^cNivel de significancia de los efectos tratamiento (T), digesta (D) e interacción tratamiento por digesta (T×D).

6. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue evaluar diferentes tratamientos que pueden realizarse sobre los granos de sorgo para mejorar el aprovechamiento digestivo de los nutrientes, fundamentalmente el almidón, cuando este cereal se utiliza en dietas para cerdos. La evaluación realizada sobre los genotipos de granos utilizados en el Experimento 1 permitió tener información de un espectro amplio de variedades comerciales de granos que se diferencian en su contenido de taninos. Posteriormente, para el Experimento 2, escogimos un genotipo que *a priori* es de preferencia para ser utilizado en alimentación de monogástricos, buscando que los tratamientos realizados sobre los granos permitieran confirmar el efecto positivo del ensilado o reconstitución para optimizar la utilización de nutrientes cuando el sorgo es el principal componente energético de una dieta completa.

En el Experimento 1, los tratamientos evaluados (remojo, reconstitución de granos enteros y reconstitución de granos molidos) provocaron cambios en la composición química de los granos que están relacionados con el grado de digestión del almidón. Los niveles de taninos y almidón disminuyeron en todos los tratamientos, y este efecto fue más evidente en los granos reconstituidos, tanto en los enteros como en los molidos. El proceso de ensilaje genera condiciones para el crecimiento y actividad de la microbiota anaerobia epífita, produciendo ácidos orgánicos y acidificación dentro del silo (Pahlow et al., 2003), lo que induce la inactivación de taninos condensados, despolimerizándolos a compuestos de bajo peso molecular (Lopes et al., 2017; Mitaru et al., 1984b). En el mismo sentido, el contenido de almidón disminuyó con los tratamientos, observándose una reducción máxima del 10,5% en los granos que fueron ensilados molidos. Esta disminución puede deberse a la degradación o solubilización de la matriz proteica del endospermo del grano, lo que facilita la hidrólisis del almidón por parte de la microbiota en el silo (Arcari et al., 2016). Este resultado es consistente con el aumento de la concentración de amilosa (g/100 g de almidón) en los granos ensilados ya que la fracción de amilopectina puede sufrir un mayor ataque microbiano durante el proceso de ensilado. La disminución del contenido de almidón también es coherente con el aumento del contenido de N en los granos reconstituidos molidos.

El estudio de las cinéticas de digestión del almidón es útil para clasificar la magnitud y la velocidad de digestión del almidón en los cereales (Giuberti et al., 2012a), parámetros que tienen una alta correlación con las respuestas de glicemia postprandiales (Giuberti et al., 2012b; van Kempen et al., 2010). No hemos encontrado reportes sobre el uso de estos métodos para evaluar la eficiencia del ensilaje de granos inmaduros o la reconstitución de granos secos de sorgo como forma de mejorar la utilización digestiva del almidón en cerdos. Los granos de sorgo reconstituidos tanto enteros como molidos fueron los que presentaron las mayores curvas de digestión acumulada de almidón durante el tiempo de incubación, seguramente debido a que en estos tratamientos hubo una reducción en el contenido de taninos condensados. Esto quedó de manifiesto al observarse correlaciones

negativas entre los contenidos de taninos de los granos y parámetros de digestión *in vitro*. En el mismo sentido, el efecto negativo de los taninos sobre la digestibilidad del almidón se evidencia al relacionarse positivamente con el contenido de almidón resistente de los granos. También es posible que el proceso de rehidratación y ensilaje haya afectado la descomposición de las kafirinas y la integridad de los tejidos del grano (Bhattarai et al., 2018), factores que aumentan la digestión del almidón. De todas maneras, no podemos confirmar estos efectos debido a que en este experimento no determinamos los contenidos de kafirinas de los granos.

La digestión del almidón de los cereales también está relacionada con la relación amilosa:amilopectina de los granos, ya que, la digestibilidad del almidón es menor en aquellos con mayor contenido de amilosa (Stevnebø et al., 2006). La amilosa tiene una estructura lineal, con enlaces de hidrógeno más extensos, lo que la hace más fácilmente retrógrada y por lo tanto más resistente a las enzimas hidrolíticas que la estructura ramificada de la amilopectina (Zhou and Kaplan, 1997). En nuestro estudio, la molienda, rehidratación y ensilado de los granos provocó en promedio una reducción del 9,2% en el contenido de amilopectina con respecto a los granos secos sin tratar, por lo que la hidrólisis que sufrió el almidón durante el ensilaje parece haber afectado en mayor medida a este polímero. Sin embargo, estos cambios en la relación amilosa:amilopectina no se reflejaron en la digestibilidad *in vitro* del almidón, revelando que otros factores del grano, como el nivel de taninos, la estructura proteica del endospermo o el tamaño de partícula de los gránulos de almidón podrían tener efectos más relevantes sobre la magnitud de la digestión del almidón.

La cinética de la digestión del almidón difirió entre tratamientos. Como se informa en la literatura, las altas tasas de digestión del almidón (/min) dan como resultado la digestión completa del almidón al final del intestino delgado en los cerdos (Al-Rabadi et al., 2011; Sun et al., 2006). Observamos que la digestibilidad del almidón (g/100 g de almidón) en los granos reconstituidos molidos fue la más alta y casi completa durante los 240 minutos de incubación, y aunque esperábamos que los tratamientos tuvieran un efecto positivo en la digestibilidad potencial del almidón, no preveíamos una digestibilidad tan elevada en esos granos. Posiblemente, alguna fracción del almidón de digestión rápida podría haber sido consumida por la actividad microbiana durante el proceso de ensilado, lo que se refleja en un nivel más bajo de ARD en los granos fermentados con respecto a los granos secos. Asimismo, considerando la alta digestión de los granos reconstituidos, encontramos que el contenido de almidón digestible supera el efecto adverso de la pérdida de almidón por el proceso de ensilaje, ya que los granos reconstituidos, tanto enteros como molidos, tuvieron una digestión del almidón 27% y 47% respectivamente más alta que los granos sin tratar.

Los valores de *IGp* de los granos fueron mayores cuando éstos fueron reconstituidos, lo que hace prever mayores respuestas en la glicemia posprandial cuando estos granos se

utilizan para la alimentación de cerdos. Con base en este índice es posible suponer efectos sobre el consumo voluntario de alimentos. Los cereales con un índice glicémico aumentado mejoran la respuesta de la insulina, lo que conduce a un rápido clearance de la glucosa en la sangre, y un rápido retorno al estado de ayuno, lo que podría resultar en un aumento en el consumo de alimento (Menoyo et al., 2011) por parte del animal. Mecanismos similares serán discutidos más adelante, vinculando el metabolismo y regulación de la glicemia con la retención proteica en cerdos en crecimiento.

La digestibilidad *in vitro* de la MS evaluada por el método en dos etapas (descrito por Cone et al., 2005) no reflejó con precisión los datos observados en la digestión *in vitro* del almidón. Además del hecho de que se utilizaron diferentes procedimientos, la digestión de la MS refleja el resultado en un momento específico de medición (90 min), mientras que el otro es el punto final de una digestión más larga (240 min). A pesar de estas diferencias, la digestibilidad *in vitro* de la MS fue mayor en los granos reconstituidos molidos que en los tratamientos remojado y reconstituido enteros, destacando la necesidad de moler el grano antes de ser ensilado para mejorar el aprovechamiento digestivo de los nutrientes. Según la dinámica de la producción de gas *in vitro*, los tratamientos no difirieron en la cantidad de gas producido, pero sí en la velocidad de fermentación. Aunque los granos que fueron menos digeridos en presencia de pepsina y pancreatina deberían ser los que proporcionen más sustratos para la fermentación en el intestino posterior, esto no se reflejó en la cantidad de gas producido. Las cantidades de almidón que quedaban disponibles para la fermentación eran similares, y este efecto se reducía o podía ser enmascarado por la presencia de otros componentes fermentables en los sustratos, como la fibra (Suarez-Belloch et al., 2013). Por otro lado, por los resultados de la digestión *in vitro* del almidón, el proceso de molienda, rehidratación y ensilado de los granos (RGM) parece haber afectado de alguna manera la estructura del almidón, ya que al medir la fermentación de estos granos la microbiota utilizó los sustratos más rápido dado que aumentó la velocidad de fermentación en este tratamiento.

Como conclusiones de este primer experimento, pudimos comprobar que todos los tratamientos evaluados mejoraron la digestión del almidón, pero la combinación de molienda, rehidratación y ensilado del grano condujo a los niveles más altos de digestibilidad. Aunque la fermentación durante el ensilado provocó pérdidas de almidón, el aumento de la digestibilidad superó en gran medida este efecto adverso, lo que resultó en un almidón más digestible por unidad de alimento. Además, la combinación de técnicas *in vitro* que simulan diferentes segmentos del tracto gastrointestinal puede darnos información preliminar sobre la digestión del almidón, lo que permite orientar decisiones a implementar sobre el procesamiento de granos de cereales para ser utilizados en la alimentación de cerdos.

En base a la información obtenida en el primer ensayo, el Experimento 2 fue orientado para comparar el aprovechamiento digestivo del almidón de granos de sorgo sometidos a

diferentes tratamientos postcosecha cuando son utilizados en la formulación de dietas completas para cerdos. Los tratamientos se basaron en la fermentación (mediante la reconstitución de granos secos o mediante el ensilaje de granos inmaduros cosechados con alta humedad) de granos cosechados a partir de un mismo cultivo. A nivel de sistemas productivos estos tratamientos pueden ser útiles para conservar los granos y a la vez para intentar aumentar su valor nutricional. Nuestra hipótesis original fue que el almidón de los granos inmaduros ensilados sería más digestible que el de los granos secos maduros y, además, que la reconstitución de los granos secos tendría efectos similares al ensilaje de los granos húmedos. Para esto, reconstituimos los granos cosechados secos al mismo nivel de humedad que los cosechados temprano. Al comparar los contenidos de humedad en los granos reconstituidos y en los ensilados, observamos que este parámetro fue similar en ambos tratamientos (403 vs. 418 g/kg, respectivamente; valor de P del contraste = 0,335; Cuadro 5). Adicionalmente, los valores de pH medidos en esos granos fueron iguales o menores a 4, lo que indicaría un buen proceso de fermentación y una conservación eficiente de los granos. De todas formas, no fueron realizadas evaluaciones adicionales del proceso de ensilaje (por ej. determinación de la estabilidad aeróbica).

Los tratamientos a los que fueron sometidos los granos tuvieron impacto sobre la composición química. Aunque el contenido de almidón en los granos de cereales puede variar con el grado de madurez (Kaufman et al., 2017) siendo menor en los granos inmaduros, parecería que los tratamientos que implican la fermentación de los granos se asociaron a disminuciones en el contenido de almidón, dada la disminución en el contenido de este polímero en los granos reconstituidos con respecto a los secos, de igual forma a lo observado en el Experimento 1. Del mismo modo que en el primer ensayo, los tratamientos provocaron modificaciones en las características del almidón ya que los granos fermentados presentaron menores niveles de almidón de digestión rápida (ARD) y de almidón resistente (AR), y a su vez mayor contenido de almidón de digestión lenta (ALD), es decir que el proceso de fermentación anaerobia se asoció a la degradación de las porciones de almidón más susceptibles al ataque microbiano dentro del silo (Arcari et al., 2016).

Se ha reportado que los procesos de fermentación de los granos de cereales como maíz y sorgo, se vinculan a disminuciones en los contenidos de prolaminas en el endospermo (Arcari et al., 2016; El Khalifa y El Tinay, 1994; Hoffman et al., 2011), generando condiciones más favorables para la degradación del almidón. No obstante, en este experimento el efecto de los tratamientos sobre los niveles de kafirinas de los granos y las diferentes fracciones del almidón no fueron los esperados. Los niveles de kafirinas en los granos fueron llamativamente bajos, y parecieran mantenerse incambiados por el proceso de fermentación. Otros autores han reportado concentraciones de kafirinas en granos de sorgo bajos en taninos en un rango de 41,4 a 67,1 g/kg, cuando los contenidos de proteína bruta de esos granos estuvieron en un rango de entre 81 a 137 g/kg (Truong et al., 2017). De hecho, en nuestro trabajo, los granos con contenidos más elevados de

kafirinas fueron los que se cosecharon inmaduros y ensilaron. Esto podría deberse a menores concentraciones de otras fracciones dentro de los granos inmaduros, por ej. almidón, con respecto a los granos cosechados secos.

Del mismo modo, si tomamos en cuenta el contenido en taninos condensados de los granos vemos que el comportamiento fue similar al de las kafirinas, con concentraciones de taninos más altas en los granos inmaduros ensilados que en los secos. Esto podría también explicarse por diferencias de concentraciones de diversos componentes de los granos inmaduros y maduros. Por otra parte, el efecto de la fermentación de los granos no tuvo efecto sobre los niveles de taninos medidos, como sí fue observado en el Experimento 1. Esto pudo deberse a que en este experimento se utilizó un genotipo bajo en taninos, y que la caracterización de los compuestos fenólicos fue a través de un método que determina proantocianidinas (Makkar, 2000), método que tal vez no fue lo suficientemente sensible para la caracterización de los compuestos fenólicos presentes en estos granos de sorgo. Además, es posible que los compuestos fenólicos presentes en la variedad de sorgo utilizado en este estudio fueran más resistentes a procesos de hidrólisis (Lopes et al., 2017), o a que las concentraciones de los compuestos fenólicos detectados ya estuvieran a nivel máximo en etapas iniciales del desarrollo de los granos en el cultivo.

Por otra parte, el mayor contenido de almidón resistente en los granos de sorgo seco indica un mayor contenido de almidón físicamente inaccesible o atrapado dentro de los gránulos (Englyst et al., 1992; Sun et al., 2006), que parece reducirse con los procesos de reconstitución y ensilaje. En el mismo sentido, los granos fermentados presentaron una mayor digestión del almidón al minuto 240, y valores de IH y *IGp* más altos que los granos secos, siendo similares a los observados en los granos reconstituidos analizados en el Experimento 1. Los niveles de *IGp* en los granos fermentados en el presente estudio fueron altos ($IGp \geq 70$), mientras que los granos secos tuvieron valores medios (*IGp*: 56 a 70) tomando en cuenta datos reportados en estudios previos (Giuberti et al., 2012a). Considerando estas variables, pareciera que los procesos de ensilaje y reconstitución generaron un impacto positivo sobre los granos, dado que en los cerdos los alimentos con índices glicémicos altos se asocian con mayores respuestas de glucosa posprandial (Giuberti et al., 2012b), niveles más altos de secreción de insulina (Regmi et al., 2010), así como mayores ganancias diarias de peso y mayor retención de tejido magro (Drew et al., 2012).

Al evaluar las fracciones de almidón y parámetros de digestión *in vitro* de las dietas completas conteniendo los granos de sorgo (Cuadro 6; Figura 5) observamos respuestas que inicialmente no esperábamos. Las dietas experimentales se diferenciaron únicamente en el contenido de almidón resistente, siendo mayor en la dieta SEC que en las otras dos, siguiendo el mismo sentido de los resultados observados en los granos incubados solos. Sin embargo, al medir la digestibilidad *in vitro* del almidón durante los 480 min de

incubación observamos que los tratamientos se comportaron de forma similar hasta los 240 min y que al final del período de incubación el tratamiento conteniendo los granos secos (SEC) presentó mayores digestibilidades del almidón que la dieta conteniendo granos ensilados (ENS). Además, si consideramos la digestibilidad del almidón en cada punto de medición individual observamos que a los 20 min de incubación la dieta SEC fue la que presentó mayor digestibilidad del almidón, lo que está relacionado con su contenido en granos que tenían un mayor nivel de almidón de digestión rápida. Por otra parte, la digestión *in vitro* del almidón registrada para las tres dietas fue relativamente elevada, y con valores de IH y de *IGp* altos para dietas formuladas en base a granos de sorgo (Giuberti et al., 2012a). Seguramente, la alta digestibilidad del almidón propia de este genotipo de sorgo pudo enmascarar impactos importantes previamente esperados al ensilar o reconstituir los granos. Asimismo, pareciera que en este tipo de genotipo de sorgo con bajo contenido de taninos y bajo contenido relativo de prolaminas, tratamientos que apunten a mejorar el aprovechamiento digestivo del almidón a través del ensilaje o reconstitución de los granos tal vez sean innecesarios o incluso contraproducentes, ya que estos procesos de fermentativos pueden consumir las fracciones más degradables de los almidones.

Los resultados observados en el consumo relativo de alimento indican un posible efecto negativo del proceso de ensilaje de los granos, ya que el consumo de alimento de las dietas que contenían granos fermentados fue menor que el tratamiento SEC. Se ha indicado que el ensilaje de granos con niveles de humedad superiores al 28% llevan a una alta producción de ácidos orgánicos dentro del silo, generando que los granos sean menos palatables para los cerdos (Hawton et al., 1980). De todas formas, no observamos diferencias en las ganancias diarias de peso, lo que resultó en una menor conversión alimentaria en los que recibieron la dieta SEC.

Por otra parte, se observaron algunas diferencias en la digestibilidad de los nutrientes. La digestibilidad aparente de la proteína bruta de la dieta ENS tendió a ser menor que la de la dieta REC, posiblemente debido a diferencias en el contenido de kafirinas de ambas dietas, siendo 27,7 g/kg y 20,3 g/kg para la dieta ENS y REC respectivamente. Si bien estas diferencias son sutiles, las kafirinas son proteínas hidrófobas, con un perfil de aminoácidos pobre, y sus fracciones β y γ localizadas en la periferia del cuerpo proteico forman enlaces disulfuro, lo que reduce su digestibilidad (Liu et al., 2015; Nyannor et al., 2007). Otros factores que pueden influir de manera negativa sobre la digestibilidad de la proteína en dietas que contienen sorgo son la presencia de taninos (Liu et al., 2015; Mariscal-Landín et al., 2004) y otros polifenoles (Khoddami et al., 2015), o la presencia de fitatos (Selle et al., 2012; Zouaoui et al., 2018), factores que también podrían estar implicados en este caso. Las diferencias en las digestibilidades de las fracciones de fibra detergente neutra y ácida y de hemicelulosas fueron llamativamente bajas en las dietas conteniendo granos reconstituidos y ensilados, y parecieran estar relacionadas con algunos de los factores antes mencionados, o a interacciones entre la fracción fibra con

otros componentes de la dieta (Urriola y Stein, 2010). Si bien la digestibilidad aparente ileal del almidón fue alta en las 3 dietas, y se asemeja a los resultados de digestión *in vitro* observados, es necesario considerar un posible sesgo en estos resultados debido a la cantidad de digesta que fue posible recuperar del íleon de los animales, pudiendo ser una muestra poco representativa del contenido del íleon (Darragh y Hodgkinson, 2000). En cualquier caso, todo parecería indicar que para este genotipo de grano los tratamientos que implican la reconstitución o el ensilaje no se justificarían como forma de aumentar el aprovechamiento digestivo del almidón a nivel de íleon.

Con respecto a los parámetros de balance del N, observamos que los lechones alimentados con la dieta ENS excretaron una mayor cantidad diaria de N que los que recibieron REC, y además la relación entre el N urinario y el N ingerido tendió a ser menor en los alimentados con SEC. No obstante, al comparar las retenciones totales y relativas de N observamos que no existieron diferencias entre tratamientos. Las retenciones de N se relacionan con el índice glicémico de las dietas, ya que alimentos con índices glicémicos altos provocan aumentos rápidos de glucosa y de insulina en sangre, seguido por un descenso precipitado de la glicemia debido a la acción de la insulina, lo que determina el inicio del hambre estimulando el comienzo de una nueva comida, y en consecuencia el aumento de peso (Drew et al., 2012; Menoyo et al., 2011; Bell y Sears, 2003).

Por otra parte, el metabolismo de la glucosa también se relaciona con la deposición y síntesis de tejido magro. Las mayores tasas de digestión del almidón provocan aumentos de glicemia, estimulan la liberación de insulina que actúa sobre las células del organismo estimulando la captación de aminoácidos por parte del tejido muscular, e inhibiendo la degradación de las proteínas musculares (Drew et al., 2012), lo que vincula el metabolismo del N con componentes de señalización asociados a la insulina y a las características del almidón. Las dietas utilizadas en este trabajo tuvieron un índice predicho de glicemia relativamente alto ($pGI > 70$) cuando son comparadas con otros alimentos almidonosos (Giuberti et al., 2012a; Ottoboni et al., 2019). Además, la alta eficiencia en la retención de N observada probablemente estuvo vinculada a la presencia sincrónica de almidón y proteínas, ya que una mayor eficiencia de deposición de tejido magro en cerdos se asocia a una mayor activación de componentes de señalización de tipo insulina (Suryawan et al., 2006), y a que seguramente los niveles de kafirinas y taninos en los granos no fueron lo suficientemente altos como para provocar disminuciones acentuadas en la digestibilidad del almidón y de los aminoácidos. En este sentido, Reis de Souza et al. (2019) observaron que la digestibilidad ileal del almidón y de los aminoácidos en dietas para cerdos conteniendo granos de sorgo no fue afectada por el nivel de kafirinas de los granos (42,5 a 57,0 g/kg de kafirinas), pero la digestibilidad de los aminoácidos sí se vio disminuida por efecto de los niveles de taninos que contenían los granos (0,03 a 6,9% de taninos en los granos bajos y altos respectivamente).

Considerando otros parámetros evaluados en este estudio, se observó que la excreción fecal fue afectada por los tratamientos. Los lechones alimentados con la dieta que contenía granos ensilados excretaron 33% más de heces frescas por día que los que recibieron la dieta REC, y esa tendencia se mantuvo al comparar la excreción fecal expresada en gramos secos entre ambos tratamientos (Cuadro 12; $P = 0,056$), seguramente debido al mayor consumo relativo de MS en los lechones que recibieron ENS. Si tomamos en cuenta la concentración de las diferentes fracciones de nutrientes en las heces, únicamente encontramos que los niveles de FND y FAD en las heces de los lechones alimentados con REC y ENS (34% y 25%, y 32% y 24% en base seca, respectivamente) tendieron a ser mayores que en los que recibieron SEC (26% y 19% respectivamente; $P = 0,07$ y $P = 0,08$) lo que se asocia con las diferencias observadas en las digestibilidades de las fracciones fibrosas entre tratamientos. Posiblemente, los menores contenidos de MS de las digestas del ciego y colon en los lechones que recibieron las dietas REC y ENS tengan relación con esos mayores contenidos de fibra, lo que puede generar una mayor viscosidad y capacidad de retención de agua en la digesta en esos tratamientos (Hooda et al., 2011; Lindberg, 2014).

Si bien las digestibilidades de la MS y MO fueron similares entre las dietas, el tratamiento ENS fue el que presentó menores valores numéricos, lo que podría explicar en parte la mayor excreción fecal observada. Los valores de pH medidos en los distintos segmentos del intestino y heces no difirieron entre tratamientos, pero sí lo hicieron dentro de cada tratamiento para cada sitio de medición. El pH de la digesta y de las heces depende de la concentración de ácidos orgánicos que contienen. La absorción de ácidos grasos volátiles desde el lumen intestinal es casi completa (Bergman, 1990), difundiendo rápidamente a través de las membranas de las células epiteliales de forma pasiva o mediante transportadores (Bach Knudsen et al., 2016; Martínez-Puig et al., 2003), lo que está de acuerdo con las variaciones de pH registradas en los diferentes puntos de medición.

La fermentación y los ácidos orgánicos producidos en el intestino grueso se estudiaron mediante dos procedimientos: a través de una técnica de fermentación *in vitro* donde se incubaron las dietas experimentales pre-digeridas con materia fecal proveniente de los lechones alimentados con esas mismas dietas, y además los ácidos orgánicos se midieron directamente en las digestas del ciego y del colon de los lechones sacrificados al final del experimento. De esta forma, fue posible registrar las cinéticas de fermentación a lo largo de 72 h de incubación, la producción de ácidos orgánicos en dos momentos diferentes del proceso de fermentación (24 y 72 h), así como en dos puntos diferentes del tubo digestivo.

Los mayores volúmenes de gas registrados cuando incubamos el residuo de pre-digestión con heces frescas de lechones que consumieron la dieta SEC son el resultado de las menores digestibilidades *in vitro* de la MO observadas para este tratamiento (Cuadro 10). En este experimento, cuando incubamos materia fecal sin sustrato en los frascos de fermentación *in vitro* (blancos de fermentación) observamos diferencias en los

volúmenes de gas acumulado, siendo el inóculo proveniente del tratamiento SEC el que produjo más gas, seguido de REC y por último ENS ($P < 0,001$). Esto indica que mayores cantidades de sustratos fermentables como por ej. almidón resistente, llegaron al intestino grueso en los lechones alimentados con SEC, aunque considerando las altas digestibilidades del almidón observadas en ileon, otros sustratos como fibra fermentable o incluso aminoácidos pudieron estar involucrados (De Schrijver et al., 1999; Suarez-Belloch et al., 2013). Por otro lado, el residuo de pre-digestión de la dieta con granos ensilados (ENS) parece haber tenido un menor contenido de sustratos fermentables, lo que denota un mayor uso de nutrientes digestibles, incluyendo al almidón, en tramos previos del tracto gastrointestinal. Si comparamos las dietas formuladas con sorgos fermentados (REC y ENS) con la dieta SEC, parece que el proceso de fermentación genera condiciones favorables para una mayor digestión del almidón y otros nutrientes (Lopes et al., 2017; Mitaru et al., 1984a). Además, los sustratos fermentables en los tratamientos REC y ENS estuvieron rápidamente disponibles para la microbiota y fermentaron más rápido, mientras que la fermentación en el tratamiento SEC alcanzó volúmenes de gas comparables después de 10 h de iniciada la incubación (Fig. 6). Probablemente, las variaciones observadas en las cinéticas de fermentación podrían deberse a diferencias en el contenido de AR en los diferentes granos utilizados en las dietas experimentales.

Las diferencias observadas en los parámetros de fermentación *in vitro* se reflejaron en la producción de AGCC y AGCR medida después de 24 y 72 h de incubación. De hecho, el tratamiento SEC fue el que generó la mayor cantidad de AGCC totales, AGCR, propionato a la vez que los mayores volúmenes de gas producido. La producción de AGCC está relacionada con la cantidad y tipo de sustratos fermentables que llegan al intestino grueso y son el principal producto final de la fermentación de la microbiota (Calabrò et al., 2013). Además, si bien no se presenta la composición química de las dietas pre-digeridas, posiblemente la dieta SEC pre-digerida haya tenido una mayor fracción de PB lo se asocia a una mayor fermentación de aminoácidos de cadena ramificada que provoca una mayor producción de AGCR (Regmi et al., 2011; Ying et al., 2013). Los AGCC tienen un efecto trófico sobre el epitelio intestinal manteniendo la integridad de la mucosa frente a patógenos (Calabrò et al., 2012), siendo de especial interés el butirato por ser una fuente de energía y estimulante de la mitosis de los enterocitos (Claus et al., 2007; Giuberti et al., 2014). Si bien el tratamiento SEC generó condiciones más favorables para la fermentación al estar formulado con granos con mayor contenido de AR, esto no fue concluyente en términos de producción de butirato, ya que se produjeron cantidades similares con las dietas SEC y ENS. Las concentraciones de ácidos grasos medidos en las digestas del ciego y del colon tuvieron algunas similitudes con respecto a los valores *in vitro*, ya que en ambas determinaciones las producciones de propionato, butirato y AGCR fueron mayores o tendieron a ser mayores en el tratamiento SEC con respecto a alguna de las otras dos dietas. De acuerdo al perfil de producción de ácidos orgánicos medidos en el ciego y colon, y a las cinéticas de fermentación registradas pareciera que en los lechones alimentados con SEC la fermentación se produjo en porciones más distales del intestino.

De todas formas, el perfil de fermentación en los tratamientos SEC y ENS parecen que tienen un cierto componente de AR dada la producción de butirato (Giuberti et al., 2015), aunque la producción de AGCR en los tratamientos SEC y REC indica de que también existió fermentación de aminoácidos (Macfarlane y Macfarlane, 2003). En cualquier caso, la presencia de AR con la inclusión de granos de sorgo en las dietas para cerdos en crecimiento podría ser interesante como una forma de generar algunos productos de fermentación en el intestino grueso altamente vinculados a la salud intestinal (Jha et al., 2019), siempre y cuando esto no se convierta en una limitante para la digestión del almidón en el intestino delgado.

En síntesis, en el Experimento 2 los procesos de reconstitución y ensilaje provocaron algunas modificaciones en la composición química de los granos de sorgo, en términos de pérdidas de algunas fracciones de almidón de digestión rápida, pero presentando menores niveles de almidón resistente. Al evaluarse las dietas completas, los efectos observados en los granos solos no fueron evidentes, y la digestibilidad del almidón, tomando en cuenta el genotipo de grano utilizado, indica que los tratamientos no fueron necesarios para mejorar el aprovechamiento digestivo o el uso metabólico de los nutrientes.

7. CONCLUSIONES GENERALES

- Los resultados obtenidos indican que los tratamientos evaluados mejoran la digestión in vitro del almidón de granos de sorgo, sobre todo en genotipos con altos contenidos en taninos. En este tipo de granos, pese a apreciarse disminuciones en los contenidos de almidón, el impacto positivo de los tratamientos reduciendo el contenido de taninos y aumentando la digestión del almidón resulta en una mayor cantidad de almidón digestible por unidad de alimento.
- De todas formas, los efectos positivos de estos tratamientos, en términos del aprovechamiento digestivo del almidón o de la utilización metabólica de los nutrientes, no resultaron evidentes cuando se aplicaron sobre genotipos de granos con bajos contenidos de taninos al ser incluidos en dietas completas de lechones.
- Son necesarios estudios complementarios para esclarecer el grado en el que los granos de sorgo puedan reemplazar al maíz, y que su uso tenga una repercusión económica suficiente que permita justificar la utilización de estos tratamientos.

8. IMPLICANCIAS

- Los procesos de reconstitución y ensilaje de granos de sorgo para cerdos pueden representar una opción interesante, y fundamentalmente aplicable, en situaciones en las que se requiera mejorar el aprovechamiento digestivo de genotipos con niveles altos de taninos.
- Posiblemente, la mayor aplicabilidad de estos tratamientos se de en sistemas productivos que tengan capacidad de producir granos para producción ensilajes de alta humedad, o ante la oportunidad de compra de granos a bajo precio con respecto a otros cereales de mayor valor de mercado.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.F., Jones, R.L., Conway, P.L., 1984. High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 336, 125–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85136-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85136-1)
- Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>
- Al-Rabadi, G.J., Torley, P.J., Williams, B. a., Bryden, W.L., Gidley, M.J., 2011. Effect of extrusion temperature and pre-extrusion particle size on starch digestion kinetics in barley and sorghum grain extrudates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.097>
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists (1997). *Methods of Analysis*. 16th ed. 3rd revision. Gaithersburg, MD, USA.
- Arcari, M.A., Martins, C.M. de M.R., Tomazi, T., Santos, M.V. dos, 2016. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 60. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71>
- Audilakshmi, S., Stenhouse, J.W., Reddy, T.P., Prasad, M.V.R., 1999. Grain mould resistance and associated characters of sorghum genotypes. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1023/A:1026410913896>
- Awika, J.M., Rooney, L.W., 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* 65, 1199–1221. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.001>
- Bach Knudsen, K.E., Lærke, H.N., Ingerslev, A.K., Hedemann, M.S., Nielsen, T.S., Theil, P.K., 2016. Carbohydrates in pig nutrition – recent advances. *J. Anim. Sci.* 94, 1–11. <https://doi.org/10.2527/jas2015-9785>
- Balderrama-Pérez, V.A., Gómez-Soto, J.G., Reis de Souza, T.C., Rodríguez, E.R., Mariscal-Landín, G., 2019. Is the kafirin profile capable of modulating the ileal digestibility of amino acids in a soybean meal-sorghum diet fed to pigs? *Anim. Nutr.* <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.01.002>
- Barcellos, L.C.G., Furlan, A.C., Murakami, A.E., Silva, M.A.A. da, Silva, R.M. da, 2006. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de tanino para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 104–112. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982006000100013>
- Bauer, E., Williams, B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2001. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim. Sci.* 73, 313–322. <https://doi.org/10.1017/S135772980005829X>

- Bauzá, R., Barreto, R., Bratschi, C., Silva, D., Tejero, B., 2016. Digestibilidad fecal aparente de partidas de sorgo con diferentes contenidos de taninos, sometidos a distintas tecnologías de procesamiento en cerdos. *Agrociencia*. 20, 79–89. <https://doi.org/10.2477/vol20iss1pp79-89>
- Bauzá, R., Brambillasca, S., Fernández-García, M., Barreto, R., Silva, D., Bratschi, C., Cajarville, C., Repetto, J.L., Tejero, B., Bollazzi, I., Cardozo, A., Rosas, F., 2018. Estudio de alimentos alternativos al maíz y la harina de soja en dietas para cerdos en engorde. Serie FPTA N° 64. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo.
- Bean, S.R., Zhu, L., Smith, B.M., Wilson, J.D., Ioerger, B.P., Tilley, M., 2019. Starch and Protein Chemistry and Functional Properties, in: *Sorghum and Millets*. Elsevier, pp. 131–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00006-X>
- Bell, S.J., Sears, B., 2003. Low-Glycemic-Load Diets: Impact on Obesity and Chronic Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 357–377. <https://doi.org/10.1080/10408690390826554>
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
- Beta, T., Rooney, L.W., Marovatsanga, L.T., Taylor, J.R.N., 2000. Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0310>
- Bhattarai, R.R., Dhital, S., Mense, A., Gidley, M.J., Shi, Y.C., 2018. Intact cellular structure in cereal endosperm limits starch digestion in vitro. *Food Hydrocoll.* 81, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.027>
- Bird, A.R., Vuaran, M., Brown, I., Topping, D.L., 2007. Two high-amylose maize starches with different amounts of resistant starch vary in their effects on fermentation, tissue and digesta mass accretion, and bacterial populations in the large bowel of pigs. *Br. J. Nutr.* 97, 134–144. <https://doi.org/10.1017/S0007114507250433>
- Blakely, M.E., Rooney, L.W., Sullins, R.D., Miller, F.R., 1979. Microscopy of the Pericarp and the Testa of Different Genotypes of Sorghum 1. *Crop Sci.* 19, 837–842. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183x001900060023x>
- Boren, B., Waniska, R.D., 1992. Sorghum seed color as an indicator of tannin content. *J. Appl. Poult. Res.* <https://doi.org/10.1093/japr/1.1.117>
- Calabrò, S., Carciofi, A.C., Musco, N., Tudisco, R., Gomes, M.O.S., Cutrignelli, M.I., 2012. Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. *Ital. J. Anim. Sci.* 12, 21–27. <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e4>
- Cámara Mercantil de Productos del País. 2019. Cereales y oeliginosas. Disponible en: <http://www.camaramercantil.com.uy/softis/documentos/dl/ceroleag/>

- Cervantes-Pahm, S.K., Liu, Y., Stein, H.H., 2014. Comparative digestibility of energy and nutrients and fermentability of dietary fiber in eight cereal grains fed to pigs. *J. Sci. Food Agric.* 94, 841–849. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6316>
- Chalking, D.; Brasesco, R. 1997. *Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisorio*. Montevideo. Plan Agropecuario-INIA, 47 p.
- Chen, H.M., Lifschitz, C.H., 1989. Preparation of fecal samples for assay of volatile fatty acids by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 35, 74–6.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>
- Claus, R., Günthner, D., Letzguß, H., 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 91, 312–318. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00655.x>
- Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H., De Lange, L., 2005. Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 Pa, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.020>
- Crenshaw, J.D., Peo, E.R., Lewis, A.J., Moser, B.D., Crenshaw, T.D., 1984. The Nutritional Value of High Moisture and Reconstituted Sorghum Grain for Swine. *J. Anim. Sci.* 58, 1222–1230. <https://doi.org/10.2527/jas1984.5851222x>
- Darragh, A.J., Hodgkinson, S.M., 2000. Quantifying the digestibility of dietary protein, in: *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1850s>
- DIEA. 2019. Anuario estadístico agropecuario 2014. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
- de Lange, C.F.M., Zhu, C.H., 2012. Liquid feeding corn-based diets to growing pigs: Practical considerations and use of co-products, in: *Feed Efficiency in Swine*. pp. 63–80. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-756-1_3
- De Schrijver, R., Vanhoof, K., Vande Ginste, J., 1999. Effect of enzyme resistant starch on large bowel fermentation in rats and pigs. *Nutr. Res.* [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00053-6)
- del Palacio, A., Mionetto, A., Bettucci, L., Pan, D., 2016. Evolution of fungal population and mycotoxins in sorghum silage. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33, 1864–1872. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1244732>
- Dlamini, N.R., Taylor, J.R.N., Rooney, L.W., 2007. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.017>

- Doherty, C., Faubion, J., Rooney, W., 1982. Semiautomated determination of phytate in sorghum and sorghum products. *Cereal Chem.*
- Drew, M.D., Schafer, T.C., Zijlstra, R.T., 2012. Glycemic index of starch affects nitrogen retention in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 1233–1241. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3458>
- Dykes, L., Rooney, L.W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>
- Earp, C.F., McDonough, C.M., Awika, J., Rooney, L.W., 2004. Testa development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.11.005>
- El Khalifa, A.O., El Tinay, A.H., 1994. Effect of fermentation on protein fractions and tannin content of low- and high-tannin cultivars of sorghum. *Food Chem.* 49, 265–269. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90171-6)
- Elkhalil, E.A.I., Tinay, A.H. El, Mohamed, B.E., Elsheikh, E.A.E., 2001. Effect of malt pretreatment on phytic acid and in vitro protein. pdf 72, 30–33.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H., 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x>
- FAOSTAT. 2020. Production. Crops. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- De Blas, C.; Gasa, J.; Mateos, G.G.; López-Bote, C.; Gorrachategui, M.; Aguilera, J.; Fructuoso, G. *Necesidades Nutricionales Para Ganado Porcino Normas FEDNA*, 2nd ed.; FEDNA: Madrid, España, 2013.
- Fenton, T.W., Fenton, M., 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can. J. Anim. Sci.* 59, 631–634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>
- Freitas, L.S. De, Lopes, D.C., Freitas, A.F. De, Costa, J., Corassa, A., Pena, S.D.M., Costa, L.F., 2006. *Revista Brasileira de Zootecnia* Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days old.
- García y Santos, C., Bettucci, L., Brambillasca, S., Cajarville, C., 2020. Storage time and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro fermentation and mold populations. *Anim. Nutr.* 6, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.08.002>
- Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Masoero, F., 2012a. In vitro starch digestion and predicted glycemic index of cereal grains commonly utilized in pig nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.006>
- Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., 2012b. Plasma glucose response and glycemic indices

- in pigs fed diets differing in in vitro hydrolysis indices. *animal* 6, 1068–1076. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002345>
- Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., Ferraretto, L.F., Hoffman, P.C., Shaver, R.D., 2014. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. *Starch/Staerke*. <https://doi.org/10.1002/star.201300177>
- Giuberti, G., Gallo, A., Moschini, M., Masoero, F., 2015. New insight into the role of resistant starch in pig nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.004>
- Gollcher, A.M.R., de Freitas Lima, J.A., Fialho, E.T., Rodrigues, P.B., de Lima, R.R., 2010. Nutritional value of high and low tannin high-moisture sorghum grain silage in horses. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 1246–1251. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000600012>
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B. a., Debersaques, F.M. a., Lantinga, E. a., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)
- Hadebe, S.T., Modi, A.T., Mabhaudhi, T., 2017. Drought Tolerance and Water Use of Cereal Crops: A Focus on Sorghum as a Food Security Crop in Sub-Saharan Africa. *J. Agron. Crop Sci.* <https://doi.org/10.1111/jac.12191>
- Hamaker, B.R., Mohamed, A.A., Habben, J.E., Huang, C.P., Larkins, B.A., 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem.* 72, 583–588.
- Hawton, J., Bache, D., McKenzie, B., 1980. High-moisture Grains for Swine. *Pork Ind. Handb.* 1–6.
- Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G.A., Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994. Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/1994.7292227x>
- Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G. a, Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994. Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 2227–36.
- Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt, R.J., Charley, R.C., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, 2465–2474. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3562>
- Hongtrakul, K., Goodband, R.D., Behnke, K.C., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Bergström, W.B., Nessmith Jr., W.B., Kim, I.H., 1998. The Effects of Extrusion Processing of Carbohydrate Sources on Weanling Pig Performance. *J. Anim. Sci.* 3034–3042.
- Hooda, S., Metzler-Zebeli, B.U., Vasanthan, T., Zijlstra, R.T., 2011. Effects of viscosity and

fermentability of dietary fibre on nutrient digestibility and digesta characteristics in ileal-cannulated grower pigs. *Br. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1017/S0007114511000985>

Humer, E., Schwarz, C., Schedle, K., 2015. Phytate in pig and poultry nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 99, 605–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>

Huntington, G.B., 1997. Starch Utilization by Ruminants: From Basics to the Bunk. *J. Anim. Sci.* 75, 852–867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>

Jha, R., Fouhse, J.M., Tiwari, U.P., Li, L., Willing, B.P., 2019. Dietary fiber and intestinal health of monogastric animals. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00048>

Kaufman, R.C., Wilson, J.D., Bean, S.R., Xu, F., Shi, Y.C., 2017. Sorghum starch properties as affected by growing season, hybrid, and kernel maturity, *Journal of Cereal Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.014>

Khoddami, A., Truong, H.H., Liu, S.Y., Roberts, T.H., Selle, P.H., 2015. Concentrations of specific phenolic compounds in six red sorghums influence nutrient utilisation in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 210, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.029>

Kim, I.H., Cao, H., Hancock, J.D., Park, J.S., Li, D.F., 2000. Effects of Processing and Genetics on the Nutritional Value of Sorghum in Chicks and Pigs - Review -. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.5713/ajas.2000.1337>

Kim, I.H., Hancock, J.D., Kim, J.H., Kennedy, G.A., Hines, R.H., Behnke, K.C., Nichols, D.A., 2002. Processing procedures and feeding systems for sorghum-based diets given to lactating sows. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15, 1186–1190. <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1186>

Kumar, V., Elangovan, A. V, Mandal, A.B., 2005. Utilization of reconstituted high-tannin sorghum in the diets of broiler chickens. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 18, 538–544. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.538>

Lindberg, J.E., 2014. Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 15. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-15>

Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D., Cowieson, A.J., 2008. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. *J. Anim. Sci.* 86, 3432–3439. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1234>

Liu, S., Fox, G., Khoddami, A., Neilson, K., Truong, H., Moss, A., Selle, P., 2015. Grain Sorghum: A Conundrum for Chicken-Meat Production. *Agriculture* 5, 1224–1251. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041224>

Liu, S.Y., Selle, P.H., Cowieson, A.J., 2013. Strategies to enhance the performance of pigs and poultry on sorghum-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.008>

- Lizardo, R., Peiniau, J., Aumaitre, A., 1995. Effect of sorghum on performance, digestibility of dietary components and activities of pancreatic and intestinal enzymes in the weaned piglet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 56, 67–82. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00813-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00813-3)
- Lopes, A.B.R. de C., Tse, M.L.P., Silva, A.M.R. da, Trindade Neto, M.A. da, Pereira, C.S., Saleh, M.A.D., Berto, D.A., 2017a. High-moisture sorghum grain silage with low- and high-tannin contents for weanling piglets. *Ciência Rural* 47. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>
- Llanes, N., Gozzini, M., 2013. Alimentación líquida en ganado porcino., in: XXIX Curso de Especialización FEDNA. pp. 149–169.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72. <https://doi.org/10.1079/pns2002207>
- Mahgoub, S.E.O., Elhag, S.A., 1998. Effect of milling, soaking, malting, heat treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chem.* [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00109-X)
- Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of tannins in tree foliage. FAO /IAEA Working Document IAEA, Vienna, Austria.
- Manzano, S., Williamson, G., 2010. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1773–1780. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000019>
- Marfo, E.K., Simpson, B.K., Johnson, J.S.I., Oke, O.L., 1990. Effect of Local Food Processing. *J. Agric. Food Chem* 1580–1585.
- Mariscal-Landín, G., Avellaneda, J.H., Reis De Souza, T.C., Aguilera, A., Borbolla, G.A., Mar, B., 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117, 245–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.001>
- Martens, B.M.J., Gerrits, W.J.J., Bruininx, E.M.A.M., Schols, H.A., 2018. Amylopectin structure and crystallinity explains variation in digestion kinetics of starches across botanic sources in an in vitro pig model. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9, 91. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0303-8>
- Martinez-Puig, D., Pérez, J.F., Castillo, M., Andaluz, A., Anguita, M., Morales, J., Gasa, J., 2003. Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *J. Nutr.* 133, 134–9.
- McCustion, K.C., Selle, P.H., Liu, S.Y., Goodband, R.D., 2018. Sorghum as a feed grain for animal production, Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional Attributes. AACCI. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00012-5>

- Menoyo, D., Serrano, M.P., Barrios, V., Valencia, D.G., Lázaro, R., Argente, J., Mateos, G.G., 2011. Cereal type and heat processing of the cereal affect nutrient digestibility and dynamics of serum insulin and ghrelin in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 89, 2793–2800. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3475>
- Merry, R.J., Davies, D.R., 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. *Lait*. <https://doi.org/10.1051/lait:1999112>
- Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>
- Methol, M. 2019. Maíz y sorgo: situación y perspectivas. Anuario OPYPA. Análisis sectorial y cadenas productivas. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2019>
- Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984a. Nutritive Value Of Reconstituted Sorghum Grains For Weanling Pigs. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas1984.5851211x>
- Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984b. The binding of dietary proteins by sorghum tannins in the digestive tract of pigs. *J. Nutr.* <https://doi.org/10.1093/jn/114.10.1787>
- Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1983. Improvement of the nutritive value of high tannin sorghums for broiler chickens by high moisture storage (reconstitution). *Poult. Sci.* <https://doi.org/10.3382/ps.0622065>
- Mundia, C.W., Secchi, S., Akamani, K., Wang, G., 2019. A Regional Comparison of Factors Affecting Global Sorghum Production: The Case of North America, Asia and Africa's Sahel. *Sustainability*. <https://doi.org/10.3390/su11072135>
- Myer, R. O., Gorbet, D. W., & Combs, G. E.. 1986. Nutritive Value of High- and Low-Tannin Grain Sorghums Harvested and Stored in the High-Moisture State for Growing-Finishing Swine. *Journal of Animal Science*, 62(5), 1290–1297. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6251290x>
- Noblet, J., Perez, J.M., 1993. Prediction of digestibility of nutrients and energy values of pig diets from chemical analysis. *J. Anim. Sci.* 71, 3389–3398. <https://doi.org/10.2527/1993.71123389x>
- NRC. National Research Council. 2012. Nutrient requirements of swine. 11th Rev. ed. Washington (DC): National Academies Press.
- Nyannor, E.K.D., Adedokun, S.A., Hamaker, B.R., Ejeta, G., Adeola, O., 2007. Nutritional evaluation of high-digestible sorghum for pigs and broiler chicks. *J. Anim. Sci.* 85, 196–203. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-116>

- Ottoboni, M., Tretola, M., Luciano, A., Giuberti, G., Gallo, A., Pinotti, L., 2019. Carbohydrate digestion and predicted glycemic index of bakery/confectionary ex-food intended for pig nutrition. *Ital. J. Anim. Sci.* 18, 838–849. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1596758>
- Owsley, W.F., Knabe, D.A., Tanksley, T.D., 1981. Effect of sorghum particle size on digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 52. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas1981.523557x523557x>
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of ensiling. *Silage Sci. Technol.* 31–93.
- Pan, L., Li, P., Ma, X.K., Xu, Y.T., Tian, Q.Y., Liu, L., Li, D.F., Piao, X.S., 2016. Tannin is a key factor in the determination and prediction of energy content in sorghum grains fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 2879–2889. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0457>
- Pan, L., Ma, X., Hu, J., Liu, L., Yuan, M., Liu, L., Li, D., Piao, X., 2019. Low-tannin white sorghum contains more digestible and metabolisable energy than high-tannin red sorghum if fed to growing pigs. *Anim. Prod. Sci.* 59, 524. <https://doi.org/10.1071/AN17245>
- Patricio, V.M.I., Furlan, A.C., Moreira, I., Martins, E.N., Jobim, C.C., Costa, C., 2006. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de taninos para leitões na fase de creche. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1406–1415. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500021>
- Paulk, C.B., Hancock, J.D., Fahrenholz, A.C., Wilson, J.M., Mckinny, L.J., Behnke, K.C., 2015. Effects of sorghum particle size on milling characteristics and growth performance in finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.017>
- Poelaert, C., Nollevaux, G., Boudry, C., Taminiau, B., Nezer, C., Daube, G., Schneider, Y.J., Portetelle, D., Théwis, A., Bindelle, J., 2017. Reducing agent can be omitted in the incubation medium of the batch in vitro fermentation model of the pig intestines. *Animal* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002749>
- Regmi, P.R., Matte, J., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2010. Starch chemistry affects kinetics of glucose absorption and insulin response in swine. *Livest. Sci.* 134, 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.092>
- Regmi, P.R., Metzler-Zebeli, B.U., Ganzle, M.G., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2011. Starch with High Amylose Content and Low In Vitro Digestibility Increases Intestinal Nutrient Flow and Microbial Fermentation and Selectively Promotes Bifidobacteria in Pigs. *J. Nutr.* 141, 1273–1280. <https://doi.org/10.3945/jn.111.140509>
- Reis de Souza, T.C., Ávila Árrés, I.E., Ramírez Rodríguez, E., Mariscal-Landín, G., 2019. Effects of kafirins and tannins concentrations in sorghum on the ileal digestibility of amino acids and starch, and on the glucose and plasma urea nitrogen levels in growing pigs. *Livest. Sci.* 227, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.06.022>

- Rooney, L.W., Pflugfelder, R.L., 1986. Factors Affecting Starch Digestibility with Special Emphasis on Sorghum and Corn1. *J. Anim. Sci.* 63, 1607–1623. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351607x>
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., de Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R., 2017. Tabelas brasileiras para suínos e aves, Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.
- Sang, Y., Bean, S., Seib, P.A., Pedersen, J., Shi, Y.C., 2008. Structure and functional properties of sorghum starches differing in amylose content. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf800577x>
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: A reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- Selle PH, Liu SY, Cowieson AJ. 2013. Sorghum: an enigmatic grain for chicken-meat production. In: Parra Patricia C, editor. *Sorghum: production, growth habits and health health benefits*. Hauppauge, NY: Nova Publishers Inc; p. 1–44.
- Selle, P.H., Liu, S.Y., Khoddami, A., Cai, J., Cowieson, A.J., 2014. Steam-pelleting temperatures and grain variety of finely ground, sorghum-based broiler diets. 1. Influence on growth performance, relative gizzard weights, nutrient utilisation, starch and nitrogen digestibility. *Anim. Prod. Sci.* 54, 339. <https://doi.org/10.1071/AN13080>
- Serna-Saldivar, S.O., Espinosa-Ramírez, J., 2019. Grain Structure and Grain Chemical Composition, in: *Sorghum and Millets*. Elsevier, pp. 85–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00005-8>
- Shelton, J.L., Matthews, J.O., Southern, L.L., Higbie, A.D., Bidner, T.D., Fernandez, J.M., Pontif, J.E., 2004. Effect of nonwaxy and waxy sorghum on growth, carcass traits, and glucose and insulin kinetics of growing-finishing barrows and gilts. *J. Anim. Sci.* 82, 1699–1706. <https://doi.org/10.2527/2004.8261699x>
- SOFOVAL. 2020. Sociedad de Fomento de Colonia Valdense. Costos. Cultivos de verano 2020. Disponible en: <http://www.sofoval.com/costos-de-pasturas/>
- Stevnebø, A., Sahlström, S., Svihus, B., 2006. Starch structure and degree of starch hydrolysis of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.015>
- Suarez-Belloch, J., Doti, S., Rodríguez-Romero, N., Guada, J.A., Fondevila, M., Latorre, M.A., 2013. Hindgut fermentation in pigs induced by diets with different sources or starch. *Spanish J. Agric. Res.* 11, 780–789. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013113-3958>
- Sullins, R.D., Rooney, L.W., 1975. Light and Scanning Electron Microscopic Studies of Waxy and Nonwaxy Endosperm Sorghum Varieties. *Cereal Chem.* 52, 361–366.

- Sun, T., Lærke, H.N., Jørgensen, H., Knudsen, K.E.B., 2006. The effect of extrusion cooking of different starch sources on the in vitro and in vivo digestibility in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.02.009>
- Suryawan, A., Escobar, J., Frank, J.W., Nguyen, H. V., Davis, T.A., 2006. Developmental regulation of the activation of signaling components leading to translation initiation in skeletal muscle of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 291. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00069.2006>
- Taylor, J., Bean, S.R., Ioerger, B.P., Taylor, J.R.N., 2007. Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.11.001>
- Taylor, J.R.N., 2018. Sorghum and millets: Taxonomy, history, distribution, and production, *Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional Attributes*. AACCI. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00001-0>
- Truong, H.H., Liu, S.Y., Selle, P.H., 2016a. Starch utilisation in chicken-meat production: The foremost influential factors. *Anim. Prod. Sci.* <https://doi.org/10.1071/AN15056>
- Truong, H.H., Neilson, K.A., McNerney, B. V., Khoddami, A., Roberts, T.H., Cadogan, D.J., Liu, S.Y., Selle, P.H., 2017. Comparative performance of broiler chickens offered nutritionally equivalent diets based on six diverse, “tannin-free” sorghum varieties with quantified concentrations of phenolic compounds, kafirin, and phytate. *Anim. Prod. Sci.* 57, 828–838. <https://doi.org/10.1071/AN16073>
- Truong, H.H., Neilson, K.A., McNerney, B. V., Khoddami, A., Roberts, T.H., Liu, S.Y., Selle, P.H., 2016b. Sodium metabisulphite enhances energy utilisation in broiler chickens offered sorghum-based diets with five different grain varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.016>
- Urriola, P.E., Stein, H.H., 2010. Effects of distillers dried grains with solubles on amino acid, energy, and fiber digestibility and on hindgut fermentation of dietary fiber in a corn-soybean meal diet fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 88, 1454–1462. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2162>
- van Kempen, T.A.T.G., Regmi, P.R., Matte, J.J., Zijlstra, R.T., 2010. In Vitro Starch Digestion Kinetics, Corrected for Estimated Gastric Emptying, Predict Portal Glucose Appearance in Pigs. *J. Nutr.* 140, 1227–1233. <https://doi.org/10.3945/jn.109.120584>
- van Leeuwen, P., Veldman, a, Boisen, S., Deuring, K., Van Kempen, G.J., Derksen, G.B., Verstegen, M.W., Schaafsma, G., 1996. Apparent ileal dry matter and crude protein digestibility of rations fed to pigs and determined with the use of chromic oxide (Cr2O3) and acid-insoluble ash as digestive markers. *Br. J. Nutr.* 76, 551–562. <https://doi.org/10.1079/BJN19960062>
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., Haesaert, G., 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *J.*

Sci. Food Agric. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7565>

- Wang, T., Huang, Y., Yao, W., He, Q., Shao, Y., Li, H., Li, Y., Huang, F., 2019. Effect of conditioning temperature on pelleting characteristics, nutrient digestibility and gut microbiota of sorghum-based diets for growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 254, 114227. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114227>
- Waniska, R.D., Poe, J.H., Bandyopadhyay, R., 1989. Effects of growth conditions on grain molding and phenols in sorghum caryopsis. *J. Cereal Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(89\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(89)80051-7)
- Welsch, C.A., Lachance, P.A., Wasserman, B.P., 1989. Dietary Phenolic Compounds: Inhibition of Na⁺-Dependent D-Glucose Uptake in Rat Intestinal Brush Border Membrane Vesicles. *J. Nutr.* 119, 1698–1704. <https://doi.org/10.1093/jn/119.11.1698>
- Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., 2005. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 Pa, 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.031>
- Wu, G., Ashton, J., Simic, A., Fang, Z., Johnson, S.K., 2018. Mineral availability is modified by tannin and phytate content in sorghum flaked breakfast cereals. *Food Res. Int.* 103, 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.050>
- Ying, X., Gong, J., Goff, H.D., Yu, H., Wang, Q., Cui, S.W., 2013. Effects of pig colonic digesta and dietary fibres on in vitro microbial fermentation profiles. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.* <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.03.002>
- Zhou, X., Kaplan, M.L., 1997. Soluble Amylose Cornstarch Is More Digestible than Soluble Amylopectin Potato Starch in Rats. *J. Nutr.* 127, 1349–1356. <https://doi.org/10.1093/jn/127.7.1349>
- Zouaoui, M., Létourneau-Montminy, M.P., Guay, F., 2018. Effect of phytase on amino acid digestibility in pig: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 238, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.019>

10. ANEXOS

10.1. Artículo 1.

Brambillasca, S., Fernández-García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019. Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.* 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

10.2. Artículo 2.

Brambillasca, S., Fernández-García, M., Wasem N. Arroyo J.M., Repetto, J.L., Cajarville, C. In vitro digestion of starch and fermentation parameters of diets for pigs containing dry, reconstituted, or ensiled sorghum grains.

10.3. Artículo 3.

Brambillasca, S., Fernández-García, M., Wasem N. Arroyo J.M., Repetto, J.L., Cajarville, C.. Digestion of nutrients, nitrogen retention and hindgut fermentation of diets for piglets containing dry, reconstituted, or ensiled sorghum grains.



Characterization of the *in vitro* digestion of starch and fermentation kinetics of dry sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition

Sebastián Brambillasca^{a,*}, Marina Fernández-García^a, Martín Aguerre^b, José Luis Repetto^b, Cecilia Cajarville^a

^a Departamento de Nutrición Animal, Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1, km 42,500, Libertad, San José, Uruguay

^b Departamento de Bovinos, Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1, km 42,500, Libertad, San José, Uruguay



ARTICLE INFO

Keywords:

Starch
Grain silage
In vitro digestion
Pig

ABSTRACT

The effect of soaking and rehydration plus ensiling of different dry sorghum grains on indicators of pig digestion was evaluated using *in vitro* approaches. Five commercial paddocks of sorghum grains were harvested dry and subjected to different treatment conditions: dry ground (Dry, control), grain soaked for 24 h (SG), and rehydrated and ensiled for 21 days as whole grain (EWG) or ground grain (EGG). The level of tannins was lower in the treated sorghums than in the Dry sorghums ($P < 0.01$), and in the ensiled grains the level of starch decreased ($P < 0.001$). The treatments caused an increase in the potential digestion of starch, and the EGG treatment was the one with the highest value for this variable ($P < 0.001$). The predicted glycemic index (*pGI*) and hydrolysis index (HI) values were higher in the EGG treatment and intermediate in EWG treatment with respect to Dry and SG ($P < 0.001$). *In vitro* digestion of DM was greater in the EGG treatment ($P = 0.005$), and EGG had the highest *in vitro* gas production rate ($P = 0.022$). Treatments produced changes in chemical composition and in characteristics of the starch, but the combination of the grinding, rehydration and ensiling was the one with the highest levels of digestibility.

1. Introduction

Sorghum grain is associated with lower levels of animal performance than other cereal grains when used to feed monogastric animals (Liu et al., 2013), mainly related to the fact that different genotypes of this cereal contain tannins, kafirins, and phytates, which are compounds responsible for a lower use of nutrients (Liu et al., 2015). The main effect of tannins on the nutritional value of the grain is due to the ability to form complexes with food proteins, and digestive or endogenous enzymes, which causes a low digestibility of starch and proteins (Bhat et al., 2013). Additionally, the low solubility and poor amino acid profile of the kafirins that surround the starch granules in the endosperm of the grain make the enzymatic hydrolysis of the starch

difficult (Liu et al., 2015).

The nutritional value of sorghum grains can be improved through the application of different processing methods, such as grinding (Healy et al., 1994; Owsley et al., 1981), extrusion (Kim et al., 2002) or ensiling immature grains harvested with high moisture content (Lopes et al., 2017). Ensiling can also be done in mature dry grains by adding enough moisture back with the addition of water and sealing the moist grains in anaerobic conditions so that fermentation can occur. The fermentation of the grains can reduce the negative nutritional effect of tannins (Lopes et al., 2017), and also alter the endosperm of the grain, increasing the digestibility of starch (Hill et al., 1991).

Previous results from our group indicated that the rehydration and ensiling of sorghum grains caused a reduction in the tannin contents of

Abbreviations: A, asymptotic gas production; ADF, acid detergent fiber expressed inclusive of residual ash; aNDF, neutral detergent fiber assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash; C, half-time of the asymptotic gas production; DC_t, digestion coefficient of starch for each time interval; DM, dry matter; DMCV, dry matter cumulative volume of gas; EGG, ground grain rehydrated and ensiled for 21 days; EWG, whole grain rehydrated and ensiled for 21 days; HI, hydrolysis index; N, nitrogen; OM, organic matter; *pGI*, predicted glycemic index; RDS, rapidly digestible starch; R_{max}, maximal rate of gas production; RS, resistant starch; SDS, slowly digestible starch; SG, grain soaked for 24 h; T_{max}, time of occurrence of R_{max}; TS, total starch

* Corresponding author.

E-mail address: sbrambillasca@gmail.com (S. Brambillasca).

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

Received 31 March 2019; Received in revised form 31 July 2019; Accepted 2 August 2019

Available online 03 August 2019

0733-5210/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the grains and consequently an increase in the *in vitro* fermentability and starch digestibility of sorghum for ruminants (Aguerre et al., 2015). In this context, the effects of these treatments may be related to increases in the kinetics of starch digestion, which can also favor the nutritive and energetic value of the grain when used in pig feeding. Treatments that involve the soaking and fermentation of the grains are thought to be related to an increase in the nutritive value of this cereal for pigs. To test this hypothesis, *in vitro* approaches were used to characterize the digestion of starch and fermentation kinetics of sorghum grains subjected to soaking and rehydration plus ensiling, to be used in pig nutrition.

2. Materials and methods

The Ethics Committee on the Use of Animals of the Facultad de Veterinaria (UdeLaR, Montevideo, Uruguay) approved all procedures used in this work (CEUAFVET-PI 488/17). For this study, we analyzed a collection of samples of sorghum grains used in a work previously published by our group (Aguerre et al., 2015). Briefly, the collection consisted of sorghum grains from 5 commercial demonstrative paddocks of 10 m × 30 m in surface, separated from each other by corridors 10 m wide and located in the same farm. Paddocks corresponded to the sorghum genotypes Jowar Food (white grain, low in tannins), 3034 (red grain, high in tannins), Flash 1 (red grain, high in tannins), Flash 10 (red grain, low in tannins) and BRM 1000 (red grain, high in tannins) from IPB*, San José, Uruguay. Sorghum grains were harvested as dry grains and subjected to different postharvest treatments: dry ground grain (Dry), grain soaked for 24 h (SG), or rehydrated and ensiled for 21 days as whole grain (EWG) or ground grain (EGG). For the dry and ensiled as ground grain treatments, the grains were ground in a mill with a sieve size of 3 mm. For the SG treatment, the whole grains were soaked with equal amounts of grain and water for 24 h, then the water was drained, and the grains were frozen until analysis. For the EWG and EGG treatments, the grains (whole or ground) were rehydrated up to 300 g/kg moisture, compacted with a manual press in plastic buckets of 5 kg capacity, hermetically sealed and then kept in anaerobiosis for 21 days, in a dark room at 20 °C to ensure that the fermentation process from the epiphytic microbiota was completed and the silage were stabilized.

2.1. *In vitro* digestion of starch

To characterize the *in vitro* digestion of the starch, the procedure described by Giuberti et al. (2012a) was used, which consists of enzymatic hydrolysis in two stages that simulate gastric and pancreatic digestion. Samples of sorghum were ground to a size of 1 mm and 800 mg were incubated in 50-mL tubes with a solution of 0.05 M of HCl containing pepsin (5 mg/mL; Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C under horizontal agitation. Subsequently, the pH was adjusted to 5.2 by the addition of 0.1 M of sodium acetate buffer. This buffer was prepared with 5.8 mL of glacial acetic acid added to 900 mL and pH was adjusted to 5.2 by the addition of 1 M NaOH solution; then, 0.74 g of CaCl₂ and 0.2 g of NaN₃ were added and final volume was adjusted to 1 L. Immediately after the addition of the buffer to the tubes, 5 mL of an enzymatic mixture containing 0.93 g of pancreatin (Merck 107130, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 0.05 mL of amyloglucosidase (Sigma A7095, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and 3 mg of invertase (Sigma 14504, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added. Incubations were performed for 240 min in 2 different runs. To characterize the starch digestion rates, 0.5 mL aliquots were taken from each tube at 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, and 240 min after the start of the incubation, and transferred to tubes containing 10 mL of absolute ethanol to stop the digestion. Then, glucose was determined in the aliquots by colorimetry using a glucose oxidase kit (Enzymatic Glycaemia, Wiener Lab, Rosario, Argentina).

With the data obtained from the *in vitro* incubation at different

times, an *in vitro* digestion coefficient of starch for each time interval (DC_t) as a percentage of total starch (TS) was calculated as (Stevnebo et al., 2006):

$$DC_t = (\text{amount of glucose present in time } t \times 0.9) / TS. \quad (1)$$

Areas under the digestion curve were calculated up to 180 min of incubation to obtain the hydrolysis index (HI) as the ratio between the area under the curve of each sample and the area corresponding to a sample of white bread (reference). From the HI obtained *in vitro*, a predicted glycemic index (pGI) value was calculated for each sample using the equation reported by (Giuberti et al., 2012a):

$$pGI = 1.013 \times HI. \quad (2)$$

2.2. Hindgut *in vitro* gas production

Samples of sorghum were pre-digested with pepsin and pancreatin through a two-step enzymatic procedure according to (Cone et al., 2005). Samples were ground to 1 mm and 4 g were incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks with 90 mL of 0.1 M HCl solution containing 5 g/L pepsin (Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 1.5 h at 37 °C. Then, the pH was neutralized with a 0.5 M NaHCO₃ solution, followed by 1.5 h incubation with 20 mL of 0.165 M phosphate buffer solution containing 2 g/L of pancreatin (Merck 107130, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 2 mL/L α-amylase (ANKOM Technology Inc., Macedon, NY). After this incubation, the fluid was filtered with pore size bags of 42 μm, and the bags containing the residues were dried at 55 °C. The *in vitro* digestibility of the dry matter (DM) was determined as the difference between the DM incubated and the residual retained in the bags. Then, the residue of the *in vitro* DM digestion was used to simulate the fermentation kinetics in the colon by an *in vitro* gas production process (Brambillasca et al., 2015). Samples (0.5 g) of the predigested sorghum grains were placed in 100 mL bottles, and 0.5 mL of a solution of vitamins/buffer phosphate (vitamins and KH₂PO₄), 0.5 mL of a reducing solution (Na₂S₉H₂O and cysteine HCl), and 38 mL of a basal solution (containing macro and micro-minerals, short chain fatty acids and haemin) were added to each bottle. The composition of the solutions was as described by (Williams et al., 2005). After adding the solutions, a stream of CO₂ was circulated inside the bottles, closed with butyl rubber stoppers, and stored at 4 °C for 8 h before inoculation to hydrate the substrate. Later, the bottles were tempered in a water bath at 39 °C for 2 h before being inoculated. For the inoculation, we used fresh fecal material from 3 sows fed with a diet containing sorghum. The feces were weighed and diluted with a sterile saline solution in a weight:volume ratio of 1:5. The diluted material was homogenized in a mixer and filtered through 4 layers of cheesecloth. The fluid obtained was continuously gassed with CO₂ and agitated, and the inoculum was dispensed into each fermentation bottle (< 1 h between fecal collection and inoculation). A total of 88 bottles were incubated (4 treatments × 5 varieties × 2 replicates plus 4 blanks), and the procedure was carried out in 2 different runs. Gas production was measured in the bottles at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, and 70 h after inoculation using a transducer attached to a pressure gauge (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, USA) and registered in psi units (pounds per square inch). The volume of gas was calculated from the pressure measured using an equation obtained in a previous experiment, such as:

$$\text{gas volume (mL)}: 3.9484 \times \text{Psi} + 0.2084 \times \text{Psi}^2 \quad (R^2 = 0.978). \quad (3)$$

The volumes of gas obtained during the fermentation referred to the incubated DM, and the data for cumulative gas production were fitted to the model (Groot et al., 1996):

$$\text{DMCV} = A/[1 + (C/t)^B] \quad (4)$$

where DMCV is the dry matter cumulative volume of gas produced (mL/g of DM weighed in the bottle), A is the asymptotic gas production

Table 1
Chemical composition^d (g/kg DM) and amylose content (g/100 g of total starch) of dry ground (Dry, control), soaked for 24 h (SG), rehydrated and ensiled for 21 days as whole (EWG) or ground (EGG) sorghum grains.

	Dry	SG	EWG	EGG	SEM ^e	P-value ^f
DM ^a	896 ^a	633 ^c	694 ^b	689 ^b	4.1	< 0.01
OM ^a	986 ^a	986 ^a	985 ^b	984 ^c	0.7	< 0.01
N ^a	13.4 ^b	13.0 ^{bc}	13.1 ^c	14.0 ^a	0.29	< 0.01
aNDF ^a	119	105	133	102	13.1	0.09
ADF ^a	42.5	40.5	42.6	43.4	7.08	0.73
Tannins ^a	6.80 ^a	4.16 ^b	1.76 ^c	0.94 ^c	1.971	< 0.01
EE	41.7	35.2	35.2	37.6	2.01	0.089
Starch	705 ^a	676 ^b	646 ^{bc}	631 ^c	9.7	< 0.001
Amylose	28.3 ^b	31.2 ^{ab}	32.4 ^{ab}	34.9 ^a	2.12	0.024

^a DM, dry matter; OM, organic matter; N, Nitrogen; aNDF, neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash; FAD, acid detergent fiber expressed inclusive of residual ash; EE, ether extract. ^e SEM, standard error of the mean (n = 5); ^f P, level of treatment significance. Different letters in the same row differ (P < 0.05). ^a Data according to Aguerre et al. (2015).

(mL/g DM), B is the switching characteristic of the curve, C is the time at which one-half of the asymptote has been reached (h), and t is the time (h). Maximum fermentation rate (R_{max}, mL/h) and time at which it occurs (T_{max}, h) were also calculated (Bauer et al., 2001):

$$R_{\max} = (A \times C^B) \times B \times [(T_{\max}^{-(B-1)})] / [(1 + CB) \times (T_{\max} - B)^2] \quad (5)$$

$$T_{\max} = C \times [(B - 1)/(B + 1)^{(1/B)}]. \quad (6)$$

2.3. Chemical analysis

For the chemical analyses (Table 1), the samples of sorghum were ground to a size of 1 mm and analyzed according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997) for DM by drying at 105 °C to constant weight, ash by combustion at 600 °C for 2 h, crude protein by the Kjeldahl method, and ether extract (methods 934.01, 967.05, 954.01, and 920.39, respectively). The analysis of the neutral detergent fiber (aNDF) was conducted according to Mertens (2002), using thermostable alpha-amylase and expressed including residual ash, and the acid detergent fiber (ADF) was analyzed according to Method 973.18 of the AOAC (AOAC, 1997). The condensed tannins were determined with the butanol-HCl method described by Makkar (2000). The starch and amylose contents were determined by enzymatic hydrolysis using commercial kits (K-TSTA 07/11 and K-MYL, respectively, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Sorghum grains were also characterized as rapidly digestible starch (RDS, g/kg DM), slowly digestible starch (SDS, g/kg DM), and resistant starch (RS, g/kg DM) according to Englyst et al. (1992).

2.4. Statistical analysis

All data were tested before statistical analysis to confirm that all the assumptions of analysis of variance (normality of data, homoscedasticity, independence of errors) were met, using the PROC UNIVARIATE procedure (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC).

The DCr and cumulative gas volume values at each specific time were considered dependent on the preceding time and analyzed as repeated measures, using the incubation tube or flask as the subject for the repeated measurement. Then, this parameter was compared between treatments according to the model:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + T_j + G_k (P \times T)_{ij} + e_{ijkl} \quad (7)$$

where μ is the average of the parameter, P_i is the fixed effect of the type of grain processing ($i = \text{Dry, SG, EWG and EGG}$), T_j is the fixed effect of time ($j = 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, \text{ and } 240 \text{ min, or } 2, 4, 6, 8, 10, 12,$

18, 24, 48, 72 h), G_k is the random effect of the grain sample of sorghum ($j = 1, 2, 3, 4, 5$), $(P \times T)_{ij}$ is the interaction between processing of the grain and the time and e_{ijk} is the residual error. As the time intervals were not evenly spaced, a covariance structure (SP(POW)) for residuals was applied.

The remaining data (*in vitro* digestion coefficient of starch at 240 min, ether extract, starch and amylose content in the samples, starch fractions, HI, *pGI*, *in vitro* digestion of DM and fermentation parameters) were analyzed using the SAS MIXED procedure (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC) by the model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + G_j + e_{ij} \quad (8)$$

where μ is the average of the parameter, T_i is the fixed effect of the treatment ($i = \text{dry, soaked, rehydrated and ensiled whole grain or ground grain}$), G_j is the random effect of the grain sample of sorghum ($j = 1, 2, 3, 4, 5$), and e_{ij} is the residual error. For both procedures, the "run" effect was included as a random effect. The mean comparisons were made using the Tukey test. Statistical significance was considered at $P < 0.05$ and tendencies at $P < 0.10$.

3. Results

3.1. Chemical composition of sorghum grains

The starch level of the sorghum grains used in this experiment was in a range between 631 and 705 g/kg DM and was affected by treatments (Table 1). In the treatments in which the grains were fermented, the level of starch was reduced by 9.4%, and tannin content decreased by 80.1% with respect to the dry grains ($P < 0.001$). Meanwhile, the level of amylose in the grains ensiled as ground grains (EGG) was higher than in the control grains ($P = 0.024$).

3.2. In vitro starch digestion profile

Given that at 240 min of incubation we did not reach the starch digestion plateau, we decided to compare the data between treatments in the different incubation times. The dry and soaked sorghum presented a lower magnitude of digestion than grains rehydrated and ensiled (EWG and EGG, Fig. 1). In addition, the grains rehydrated and ensiled as ground grains (EGG) were those that presented a faster and a greater extent of starch digestion (DCt = 0.953; $P < 0.001$) throughout the entire incubation period. Differences were observed from the first 20 min of incubation ($P < 0.001$), but only among the SG and Dry treatments, whereas more considerable differences in the magnitude of digestion between the grains that were ensiled (EGG and EWG) and those that were not, were observed from minute 60 of incubation ($P < 0.01$).

The starch fractions were different between treatments ($P < 0.001$; Table 2). The dry grains showed the highest content in RDS, and the soaking treatment showed a higher content in SDS, while the ensiled and grounded grains had the lowest RS content. Values of HI (64.5–89.6, $P < 0.001$) and *pGI* (65.3–90.8, $P < 0.001$) were affected by treatments. In this way, the untreated (Dry) and the soaked grains presented an average *pGI* value, while the ensiled grains (EWG and EGG) showed high values for this parameter (*pGI* > 70).

3.3. In vitro DM digestion and gas production profile

Differences were observed in the two steps of *in vitro* digestion of DM (Table 3) for sorghum grains subjected to different treatments ($P = 0.005$). The grains that were digested in greater magnitude were those of the EGG treatment, while soaked and EWG grains were digested to a lesser extent. The volumes of gas produced were similar between treatments, but the EGG grains reached the half-time of asymptotic gas production faster ($P < 0.001$) and presented the

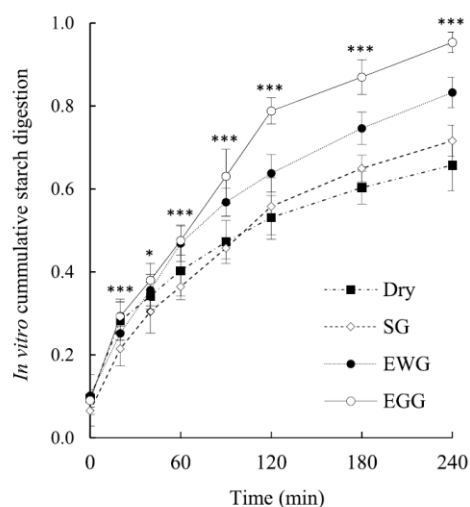


Fig. 1. Elapsed time of the average accumulated digestion of starch (as a fraction of total starch) for dry (Dry, control), soaked (SG), or rehydrated and ensiled as whole (EWG) or ground (EGG) sorghum grains. For each time point, asterisks indicate at least one significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) among treatments. Values are means ($n = 5$, \pm s.d.).

Table 2

In vitro digestion coefficient of starch at 240 min of incubation (DCI₂₄₀), starch fractions, hydrolysis index (HI) and predicted glycemic index (pGI) of dry ground (Dry, control), soaked for 24 h (SG), rehydrated and ensiled for 21 days as whole (EWG) or ground (EGG) sorghum grains.

	Dry	SG	EWG	EGG	SEM ^a	P-value ^d
DCI ₂₄₀	0.657 ^a	0.716 ^c	0.833 ^b	0.953 ^a	0.0142	< 0.001
RDS ^e	161 ^a	117 ^c	144 ^b	141 ^b	8.30	< 0.001
SDS ^h	367 ^b	386 ^a	315 ^c	353 ^b	13.00	< 0.001
RS ⁱ	177 ^a	172 ^a	187 ^a	137 ^b	14.53	< 0.001
HI ^j	64.5 ^c	65.7 ^c	77.4 ^b	89.6 ^a	1.75	< 0.001
pGI ^k	65.3 ^c	66.5 ^c	78.4 ^b	90.8 ^a	1.77	< 0.001

^a Standard error of the mean ($n = 5$). ^d Level of treatment significance; different letters in the same row differ ($P < 0.05$). ^e Rapidly digestible starch (g/kg DM). ^h Slowly digestible starch (g/kg DM). ⁱ Resistant starch (g/kg MS). ^j Calculated using white bread as reference (HI = 100). ^k Calculated according to Giuberti et al. (2012a).

Table 3

In vitro digestion and fermentation parameters of DM of dry ground (Dry, control), soaked for 24 h (SG), rehydrated and ensiled for 21 days as whole (EWG), or ground (EGG) sorghum grains.

	Dry	SG	EWG	EGG	SEM ^c	P-value ^d
IV Digest of DM ^e	0.61 ^{ab}	0.57 ^b	0.58 ^b	0.63 ^a	0.119	0.005
DMCV (mL/g DM) ^f	254	258	235	255	15.4	0.232
A (mL/g DM) ^g	255	259	231	253	16.8	0.169
C (h) ^h	17.1 ^a	17.2 ^a	17.4 ^a	13.7 ^b	0.71	< 0.001
R _{max} (h) ⁱ	8.53 ^{ab}	8.23 ^{ab}	6.74 ^b	10.31 ^a	2.342	0.022
T _{max} (mL/h) ^j	20.2 ^{ab}	20.4 ^{ab}	22.7 ^a	16.5 ^b	3.67	0.015

^c Standard error of the mean ($n = 5$). ^d Level of treatment significance; different letters in the same row differ ($P < 0.05$). ^e *In vitro* digestion of DM by incubation with pepsin-HCl and pancreatin (Cone et al., 2005). ^f DMCV: volume of accumulated gas. ^g A: asymptotic gas production. ^h C: half-time of the asymptotic gas production. ⁱ R_{max}: maximal rate of gas production. ^j T_{max}: time of occurrence of R_{max}.

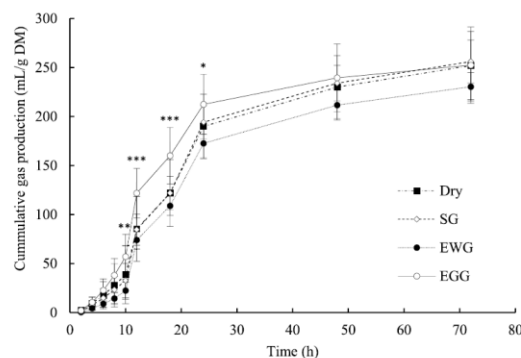


Fig. 2. Pattern of *in vitro* gas production (mL/g DM incubated) of for dry (Dry, control), soaked (SG), or rehydrated and ensiled as whole (EWG) or ground (EGG) sorghum grains. For each time point, asterisks indicate at least one significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) among treatments. Values are means ($n = 5$, \pm s.d.).

highest rate of maximum gas production ($P = 0.015$), and these differences were evident after 10 h of incubation ($P < 0.01$, Fig. 2).

4. Discussion

The treatments evaluated led to changes in the chemical composition that are related to the degree of starch digestion of the grains. The levels of tannins and starch decreased in all treatments, with greater reduction in the EWG and EGG grains. The silage process generates conditions for the growth and activity of the epiphytic anaerobic microbiota, producing organic acids and acidification within the silo (Pahlow et al., 2003), which causes the inactivation of condensed tannins and depolymerizing them to low molecular weight compounds (Lopes et al., 2017; Mitaru et al., 1984). In the same sense, the content of starch decreased with the treatments, with a maximum reduction of 10.5% in the EGG grains. This decrease may be due to the degradation or solubilization of the protein matrix of the grain endosperm, which facilitates the hydrolysis of the starch by the microbiota in the silo (Arcari et al., 2016). This result is consistent with the increase in the amylose concentration (g/100 g starch) in the ensiled grains since the amylopectin fraction underwent a greater microbial attack during the silage process. The decrease in the content of starch is also coherent with the increase in the N content in EGG grains.

The study of the kinetics of starch digestion is useful to classify the extent and speed of digestion of starch in cereals (Giuberti et al., 2012a,b). We have not found reports of the use of these methods to evaluate the efficiency of ensiling of immature grains or rehydration and ensiling of dry sorghum grains as a way to improve their digestive utilization of starch for pigs. Ensiled sorghum grains (EWG, EGG) were those that presented the highest cumulative starch digestion curves during the incubation time since these treatments caused a reduction in the content of tannins. It is also possible that the rehydration and silage process have affected the decomposition of kafirins and the integrity of the grain tissues (Bhattarai et al., 2018), factors that increase the digestion of starch. Similarly, the starch digestion of cereals is also related to the amylose:amylopectin ratio of the grains; those with higher amylose content, have lower digestibility of starch (Stevnebo et al., 2006). Amylose has a linear structure, with more extensive hydrogen bonds, which makes it more easily retrograde and therefore more resistant to hydrolytic enzymes than amylopectin (Zhou and Kaplan, 1997). In our study, the grinding, rehydration and ensiling of the grains caused a 9.2% reduction in the amylopectin content with respect to the Dry ones, pointing that the hydrolysis suffered by the starch during

silage affected this polymer to a greater extent. However, these changes in the amylose:amylopectin ratio were not reflected in the *in vitro* digestibility of the starch, revealing that other grain factors, such as the level of tannins, the protein structure of the endosperm, or the particle size of the starch granules, could have more significant effects on the magnitude of starch digestion.

Starch digestion kinetics differed between treatments. As is reported in the literature, the high starch digestion rates (/min) result in complete starch digestion at the end of the small intestine in pigs (Al-Rabadi et al., 2011; Sun et al., 2006). We observed that the digestibility of the starch (g/100 g of starch) in the EGG treatment was the highest, and almost complete during the 240 min of incubation. Although we expected that the treatments would have a positive effect on the potential digestibility of starch, we did not expect such a high digestibility in the EGG treatment. Possibly, some fraction of the fast-digested starch could have been consumed by microbial activity during the ensiling process, which is reflected in a lower level of RDS in the silage grains with respect to the Dry grains. Also, considering the high digestion of the ensiled grains, we found that the content of digestible starch surpasses the adverse effect of the loss of starch by the silage process, since the grains EWG and EGG had 27% and 47%, respectively, more digestible starch than untreated grains.

The *pGI* values were higher when the grains were ensiled (EWG and EGG treatments), suggesting greater responses in postprandial glycemia when these grains are used for pig feeding. Based on this index, it is possible to presume effects on the voluntary consumption of food. Cereals with an increased glycemic index enhance the insulin response, leading to a fast clearance of glucose in the blood and a rapid return to the hunger state, which might result in an increase in feed consumption (Menoyo et al., 2011).

The *in vitro* DM digestibility evaluated by the two-step method did not accurately reflect the data observed in the *in vitro* digestion of starch. In addition to the fact that different procedures were used, the digestion of DM reflects the result at a specific time of measurement, while the other is the end point of a longer digestion. Despite these differences, the *in vitro* DM digestibility was higher in the EGG treatment than in the soaked and EWG treatments, highlighting the need to grind the grain before the ensiling to improve the utilization of nutrients. According to the dynamics of *in vitro* gas production, treatments did not differ in the amount of gas produced but did in the rate of fermentation. Although grains that were less digested in the presence of pepsin and pancreatin should be the ones that provide more substrates for fermentation in the hindgut, this was not reflected in the amount of gas produced. The quantities of starch remaining available for fermentation were similar, and this effect was reduced or could be masked by the presence of other fermentable components in the substrates, such as fiber (Suarez-Belloch et al., 2013). On the other hand, by the results of *in vitro* digestion of the starch, the process of grinding, rehydrating and ensiling of the grains (EGG) affected in some way the starch, since at this level the microbiota used the substrates faster as it increased the fermentation speed in this treatment.

5. Conclusions

All the evaluated treatments improved the digestion of starch, but the combination of grinding, rehydrating and ensiling of the grain led to the highest levels of digestibility. Although the fermentation during ensiling caused starch losses, the increase in the digestibility greatly exceeded this adverse effect, resulting in more digestible starch per unit of feed. The combination of *in vitro* techniques that simulate different segments of the gastrointestinal tract of pigs can give us preliminary information on starch digestion, but it is necessary to confirm these findings by conducting *in vivo* approaches.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by the INIA - FPTA 326 project "Study of alternative foods to maize and soybean flour in diets for growing pigs". The authors want to thank Martín Barreto, Gianfranco Fabiani and Dr. José María Arroyo for their assistance on fermentation analysis, and Dr. Carlos Vargas for his contribution on sampling procedures.

References

- Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2015.04.016>.
- Al-Rabadi, G.J., Torley, P.J., Williams, B.A., Bryden, W.L., Gidley, M.J., 2011. Effect of extrusion temperature and pre-extrusion particle size on starch digestion kinetics in barley and sorghum grain extrudates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2011.04.097>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1997. *Methods of Analysis*, Gaithersburg, MD, USA, sixteenth ed. 3rd revision.
- Arcari, M.A., Martins, C.M. de M.R., Tomazi, T., Santos, M.V. dos, 2016. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 60. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71>.
- Bauer, E., Williams, B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Versteegen, M.W.A., 2001. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim. Sci.* 73, 313–322. <https://doi.org/10.1017/S135772980005829X>.
- Bhat, T.K., Kannan, a., Singh, B., Sharma, O.P., 2013. Value addition of feed and fodder by alleviating the antinutritional effects of tannins. *Agric. Res.* 2, 189–206. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0066-6>.
- Bhattarai, R.R., Dhital, S., Mense, A., Gidley, M.J., Shi, Y.C., 2018. Intact cellular structure in cereal endosperm limits starch digestion *in vitro*. *Food Hydrocol.* 81, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.027>.
- Brambillasca, S., Zunino, P., Cajarville, C., 2015. Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in diets for piglets: influence on nutritional and faecal parameters, intestinal organs, and colonic fermentation and bacterial populations. *Livest. Sci.* 178, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.003>.
- Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H., De Lange, L., 2005. Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2005.04.020>.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H., 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, 33–50.
- Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Masoero, F., 2012a. *In vitro* starch digestion and predicted glycemic index of cereal grains commonly utilized in pig nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2012.03.006>.
- Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., 2012b. Plasma glucose response and glycemic indices in pigs fed diets differing in *in vitro* hydrolysis indices. *Animal* 6, 1068–1076. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002345>.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7).
- Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G. a., Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994. Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 2227–2236.
- Hill, T.M., Schmidl, S.P., Russell, R.W., 1991. Comparison of urea treatment with established methods of sorghum grain preservation and processing on site and extent of starch digestion by cattle. *J. Anim. Sci.* 69, 4570–4576. <https://doi.org/10.2527/1991.69114570x>.
- Kim, I.H., Hancock, J.D., Kim, J.H., Kennedy, G.A., Hines, R.H., Behnke, K.C., Nichols, D.A., 2002. Processing procedures and feeding systems for sorghum-based diets given to lactating sows. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 15, 1186–1190. <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1186>.
- Liu, S., Fox, G., Khoddami, A., Neilson, K., Truong, H., Moss, A., Selle, P., 2015. Grain sorghum: a conundrum for chicken-meat production. *Agriculture* 5, 1224–1251. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041224>.
- Liu, S.Y., Selle, P.H., Cowieson, A.J., 2013. Strategies to enhance the performance of pigs and poultry on sorghum-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2013.01.008>.
- Lopes, A.B.R.C., Tse, M.L.P., de Silva, A.M.R., Neto, M.A.T., Pereira, C.S., Saleh, M.A.D., Berto, D.A., 2017. High-moisture sorghum grain silage with low-and high-tannin contents for weanling piglets. *Cienc. Rural.* <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>.
- Makkar, H.P.S., 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. *FAO/IAEA Working Document*. IAEA, Vienna, Austria.
- Menoyo, D., Serrano, M.P., Barrios, V., Valencia, D.G., Lázaro, R., Argente, J., Mateos,

- G.G., 2011. Cereal type and heat processing of the cereal affect nutrient digestibility and dynamics of serum insulin and ghrelin in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 89, 2793–2800. <https://doi.org/10.2527/jas.2010.3475>.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217–1240.
- Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984. Nutritive value of reconstituted sorghum grains for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 58. <https://doi.org/10.2527/jas1984.5851211x>.
- Owsley, W.F., Knabe, D.A., Tanksley, T.D., 1981. Effect of sorghum particle size on digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 52. <https://doi.org/10.2527/jas1981.523557x>.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of ensiling. *Silage Sci. Technol.* 31–93.
- Stevnebo, A., Sahlström, S., Svihus, B., 2006. Starch structure and degree of starch hydrolysis of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedscl.2006.01.015>.
- Suarez-Belloch, J., Doti, S., Rodríguez-Romero, N., Guada, J.A., Fondevila, M., Latorre, M.A., 2013. Hindgut fermentation in pigs induced by diets with different sources or starch. *Span. J. Agric. Res.* 11, 780–789. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013113-3958>.
- Sun, T., Lærke, H.N., Jørgensen, H., Knudsen, K.E.B., 2006. The effect of extrusion cooking of different starch sources on the in vitro and in vivo digestibility in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedscl.2006.02.009>.
- Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., 2005. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124, 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedscl.2005.04.031>.
- Zhou, X., Kaplan, M.L., 1997. Soluble amylose cornstarch is more digestible than soluble amylopectin potato starch in rats. *J. Nutr.* 127, 1349–1356. <https://doi.org/10.1093/jn/127.7.1349>.

1 ***In vitro* digestion of starch and fermentation parameters of diets for pigs containing dry,**
2 **reconstituted, or ensiled sorghum grains**

3 Sebastián Brambillasca ^a, Marina Fernández–García ^a, Nadia Wasem ^a, José María Arroyo ^a,
4 Cecilia Cajarville ^a, José Luis Repetto ^b

5 ^a Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,
6 Ruta 1, km 42,500, Libertad, San José, Uruguay.

7

8 **ABSTRACT**

9 The effect of including dry, reconstituted or ensiled sorghum grains in complete diets for
10 piglets on indicators of digestion was evaluated using *in vitro* methods. Sorghum grains from
11 a single crop were harvested, and complete diets were formulated with dry grains (DRY),
12 reconstituted (REC) and ensiled (ENS) grains. Diets were fed to 27 piglets housed in
13 metabolic cages, under a randomized block design. No differences in starch content were
14 observed between grains, but fermented grains had more slowly digestible starch and less
15 resistant starch than dry grains ($P < 0.01$). The potential digestion of starch did not differ
16 between treatments, although a lower content of rapidly digestible starch was observed in the
17 REC and ENS diets with respect to DRY ($P = 0.001$). *In vitro* OM digestion and fermentation
18 rates were higher in the REC and ENS diets than in DRY ($P < 0.01$), although the latter
19 produced higher volumes of gas ($P < 0.001$). The amounts of total SCFA, BCFA, propionate
20 and isovalerate were higher in the DRY treatment ($P < 0.05$), while DRY and ENS presented
21 higher levels and molar proportions of butyrate than REC ($P < 0.01$). Although the starch
22 digestion of the complete diets was not modified as initially expected, there are some changes
23 in the final fermentation products, which may be related to better intestinal health conditions.

24

25 **Keywords**

26 Grain silage; Starch; Fermentation; Short-chain fatty acids; Intestine; Pig

27

28 **1. Introduction**

29 Sorghum grain is a cereal widely used in animal feeding, which has a lower nutritional value
30 than other cereals, mainly due to the content of phenolic compounds, kafirins and phytates
31 present in some genotypes (Liu et al., 2015). Kafirins are poorly soluble proteins present in
32 the grain endosperm that limit the digestion of starch, phenolic compounds such as tannins
33 form indigestible complexes with proteins and starches, while phytates can limit intestinal
34 absorption of P, glucose and amino acids (McCustion et al., 2018). In this sense, data
35 published in feedstuff tables for pigs indicate that the energy value of high and low tannin
36 grains corresponds to 88 to 99% respectively of the energy value of corn (Rostagno et al.,
37 2017).

38

39 Different treatments can be performed to increase the nutritional value of sorghum grains.
40 Increases in the digestive use of sorghum grains have been reported through grinding (B. J.
41 Healy et al., 1994; Owsley et al., 1981), extrusion (Kim et al., 2002), reconstitution (M
42 Aguerre et al., 2015; Mitaru et al., 1984a) or ensiling of high-moisture grains (A. B. R. C.
43 Lopes et al., 2017). These treatments can be associated with decreases in the tannin content or
44 with modifications in the protein matrix of the grain.

45

46 In previous studies conducted by our group (Aguerre et al., 2015; Brambillasca et al., 2019),
47 we observed increases in the in vitro digestion of starch from different genotypes of
48 reconstituted sorghum grains, pointing the favourable effect of grain fermentation on the
49 potential digestive use of its nutrients. In both studies, approximations conducted allowed the
50 evaluation of the grains in their use for ruminants and monogastrics. In any case, it is of

51 interest to know whether the effects observed in fermented sorghum grains can also be
52 detected when the grains are included in complete diets for piglets. We hypothesized that
53 complete diets containing fermented sorghum grains should be associated with increased
54 starch digestibility. To test this hypothesis, we used in vitro approaches to evaluate the
55 potential starch digestion in the small intestine and hindgut fermentation of piglet diets
56 containing sorghum grains that were harvested with high moisture and ensiled, or dried and
57 reconstituted harvested grains.

58

59 **2. Materials and methods**

60 All procedures were approved by the Bioethics Committee of Facultad de Veterinaria
61 (UdelaR; Protocol number CEUAFVET-488). The experiment was conducted at the
62 Experimental Farm of Facultad de Veterinaria (San José Department, Uruguay; 34°41'S,
63 56°32'W).

64

65 **2.1. Grain harvest and storage**

66 A crop of a sorghum grain cultivar (Flash 10, red grain, low in tannins, from IPB[®]), was
67 divided into 9 plots or 30 × 30 m in surface each. The plots were randomly assigned to be
68 harvested at two different times: the grains from 3 plots were harvested in an immature stage
69 and with an approximate moisture content of 40%, while the grains from the remaining 6
70 plots were harvested with the grain in a mature stage and with an approximate moisture
71 content of 12%. The grains harvested with high moisture content were ground (JF 2D, JF
72 Máquinas Agrícolas Ltda, Itapira, SP, Brasil) and stored in 200 L plastic barrels under
73 anaerobic conditions. Grains from 3 plots harvested with the mature grain were ground and
74 reconstituted. For this, enough water was added to reach a moisture content of 40%, and were
75 immediately stored under anaerobic conditions in 200 L plastic barrels. Grains from the

76 remaining 3 plots were stored as whole dry grain in identical plastic barrels. We ensure that
77 the grains from each plot of the original crop were stored in different barrels to preserve the
78 previously defined random plot scheme.

79

80 2.2. Animals and experimental procedures.

81 Twenty-seven castrated crossbreed male piglets (Landrace x Large White) of 45 days of age
82 (initial BW 8.60 ± 1.88 kg) from a commercial pig farm were used in the study. Piglets were
83 individually allocated in metabolic crates (0.9×1.2 m²), blocked by weight and assigned to
84 one of three treatments. Treatments consisted in diets based on dry sorghum grain (DRY),
85 reconstituted sorghum grain (REC), and ensiled high moisture sorghum grains (ENS), made
86 from the grains harvested from the 9 plots mentioned above. Diets were formulated following
87 recommendations proposed by FEDNA (2013) and included the same level of sorghum on a
88 dry matter basis. The ingredients and chemical composition of experimental diets is presented
89 in Table 1. To maintain the random plot design followed in the crop, 3 animals received diets
90 made from the grains harvested from each plot. In this way, each treatment was consumed by
91 9 animals, with 3 animal replicates each. The experiment was based on a randomized
92 complete block design, with 12 days of adaptation to experimental diets and a period for
93 faecal sampling of 2 days (14 days in total). Animals had free access to diets and fresh water
94 throughout the experiment.

95

96 2.3. *In vitro* digestion of starch

97 To characterize the *in vitro* digestion of the starch, we used the procedure described by
98 Giuberti et al. (2012), which consists of an enzymatic hydrolysis in two stages that simulate
99 gastric and pancreatic digestion. Samples of dry experimental diets were ground to a size of 1
100 mm and 800 mg were incubated in 50-mL screw-cap tubes containing glass balls, with a

101 solution of 0.05M of HCl containing pepsin (5 mg/mL; Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint
102 Louis, MO, USA) and guar gum (5mg/mL) for 30 min at 37 °C under horizontal agitation.
103 Then, the pH was adjusted to 5.2 by the addition of 0.1M of sodium acetate buffer. This
104 buffer was prepared with 5.8 mL of glacial acetic acid added to 900 mL and pH was adjusted
105 to 5.2 by the addition of 1 M NaOH solution, 0.74 g of CaCl₂ and 0.2 g of NaN₃ were then
106 added and final volume was adjusted to 1 L. Immediately after the addition of the buffer to
107 the tubes, 5 mL of an enzymatic mixture containing 0.93 g of pancreatin (Merck 107130,
108 Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 0.05 mL of amyloglucosidase (Sigma A7095, Sigma-
109 Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and 3 mg of invertase (Sigma I4504, Sigma-Aldrich, Saint
110 Louis, MO, USA) was added. Differently from the method described by Giuberti et al.
111 (2012), in our procedure, we extended the incubation time to 480 min, since in some runs of
112 the analysis, we were unable to reach the digestion plateau. Therefore, to characterize the
113 starch digestion rates, 0.25 mL aliquots were taken from each tube at 0, 20, 40, 60, 90, 120,
114 180, 240, 360 and 480 min after the start of the incubation, and transferred to tubes containing
115 10 mL of absolute ethanol to stop the digestion. Then, glucose was determined in the aliquots
116 by colorimetry using a glucose oxidase kit (Enzymatic Glycaemia, Wiener Lab, Rosario,
117 Argentina). Incubations were performed 2 different runs. With the data obtained from the *in*
118 *vitro* incubation at different times, an *in vitro* digestion coefficient of starch for each time
119 interval (DC_t) as a percentage of total starch (TS) was calculated as (Stevnebø et al., 2006):
120

121 (1) $DC_t = (\text{amount of glucose present in time } t \times 0.9) / TS.$

122

123 Areas under the digestion curve were calculated up to 180 min of incubation to obtain the
124 hydrolysis index (HI) as the ratio between the area under the curve of each sample and the
125 area corresponding to a sample of white bread as reference. From the HI obtained *in vitro*, a

126 predicted glycemic index (*pGI*) value was calculated for each sample using the equation
127 reported by Giuberti et al. (2012):

128

129 (2) $pGI=1.013 \times HI$.

130

131 2.4. *In vitro* hindgut fermentation

132 To test the fermentative activity of the colonic microbiota and to compare it among
133 treatments, fermentation kinetics of the diets were assessed using a cumulative gas production
134 procedure. Prior to this procedure, and to simulate gastric and intestinal digestion, diets were
135 pre-digested using a two-steps incubation according to Cone et al. (2005). Diets were dried
136 and ground to 1 mm, and 4 g were incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks with 90 mL of a
137 0.1M HCl solution containing 5 g/L pepsin (Sigma P-7000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO,
138 USA) for 1.5 h in a water bath at 37 °C. Then, 20 mL of a 0.5M NaHCO₃ solution was added
139 to the flasks to neutralize the pH, and immediately 20 mL of 0.165M phosphate buffer
140 solution containing 2g/L of pancreatin (Merck 107130, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
141 and 2 mL/L α -amylase (ANKOM Technology Inc., Macedon, NY) were added. After 1.5 h,
142 the fluid within the flasks was filtered with pore size bags of 43 μ m, and the bags containing
143 the residues from incubation were dried at 55°C. The *in vitro* digestibility of the DM and OM
144 were determined as the difference between the DM and OM incubated and the residue
145 retained in the filtration bags. Later, the residues of the two-steps incubation were used to
146 simulate the fermentation kinetics in the hindgut by an *in vitro* gas production process
147 (Brambillasca et al., 2015). Samples (0.2 g) of the pre-digested diets were placed in 100 mL
148 bottles, and 30 mL of an incubation media was added to each bottle. The composition of the
149 incubation media was as described by Poelaert et al. (2017): Na₂HPO₄, 1.423 g/L; KH₂PO₄,
150 1.548 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.150 g/L; NaHCO₃, 8.738 g/L; (NH₄)HCO₃, 0.999 g/L;

151 CaCl₂·2H₂O, 1.669 mg/L; MnCl₂·4H₂O, 1.264 mg/L; CoCl₂·6 H₂O, 0.126 mg/L;
152 FeCl₃·6H₂O, 0.101 mg/L; Na₂S·9H₂O, 14.3 mg/L. After adding the incubation media, a
153 stream of CO₂ was circulated inside the bottles, closed with butyl rubber stoppers and stored
154 at 4°C for 8 h before inoculation to hydrate the substrate. Later, the bottles were tempered in a
155 water bath at 37°C for 2 h before being inoculated. For the inoculation, we used fresh faeces
156 from piglets fed the experimental diets, considering the treatments and plot scheme as
157 described before. The faeces from each piglet were pooled and 15 g were diluted in 75 mL of
158 the incubation media. The diluted material was homogenized in a stomacher (BagMixer® 400,
159 Interscience International), the fluid obtained was gased with CO₂ and 10 mL of the inoculum
160 obtained was dispensed in the fermentation bottles (<1 h between the faecal collection and
161 inoculation). After the inoculation of the bottles, butyl stoppers were fastened with aluminium
162 crimp seals and remained in the water bath throughout the measurement period. A total of 72
163 bottles were incubated (3 treatments×3 plots each×2 replicates×2 blanks; the procedure was
164 conducted in 2 different runs). Gas production was measured in the bottles at 2, 4, 6, 8, 10,
165 12, 18, 24, 48, and 72 h after inoculation using a transducer attached to a pressure gauge
166 (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, USA) and registered in psi units (pounds per square
167 inch). The volume of gas within each bottle was calculated from the pressure measured using
168 an equation obtained in a parallel trial, such as: gas volume (mL): 5.2916 × Psi – 0.7647
169 (R²=0.987). The volumes of gas obtained during the fermentation were referred to the
170 incubated OM, and the data for cumulative gas production were fitted to the model (Groot et
171 al., 1996):

172

173 (2) $OMCV = A/[1 + (C/t)^B]$

174

175 where OMCV is the OM cumulative volume of gas produced (mL/g of OM weighed in the
176 bottle, A is the asymptotic gas production (mL/g OM), B is the switching characteristic of the
177 curve, C is the time at which one-half of the asymptote has been reached (h), and t is the time
178 (h). Maximum fermentation rate (R_{\max} , mL/h) and time at which it occurs (T_{\max} , h) were also
179 calculated (Bauer et al., 2001):

180

$$181 \quad (3) \quad R_{\max} = [A \times (C^B) \times B \times (T_{\max}^{-(B-1)})] / [1 + (C^B) \times (T_{\max}^{(-B)})]^2$$

182

$$183 \quad (4) \quad T_{\max} = C \times [(B-1) / (B + 1)]^{(1/B)}.$$

184

185 Four replicates of each bottle were also incubated, and after 24 h and 72 h the bottles were
186 opened and incubation was stopped. 2 mL of fermentation broth from each bottle were
187 dispensed to microtubes, centrifuged (13.000×g, 5 min, 4°C) and stored at – 20°C until SCFA
188 analysis.

189

190 2.5. Short chain fatty acids analysis.

191 The samples from the *in vitro* fermentation flasks opened at 24 and 72 h after incubation were
192 thawed, centrifuged at 9000 × g at 2 ° C for 20 min and placed in vials to determine organic
193 acids. The concentrations of lactate and of short-chain (SCFA) and branched (SCFA) fatty
194 acids were analyzed according to (Adams et al., 1984) using a Dionex Ultimate® 3000 HPLC
195 system (Waltham, MA, USA) equipped with an Acclaim Rezex Organic Acid H + (8%) and a
196 7.8 x 300 mm column set at 210 nm and using 3 mM H₂SO₄ as eluent. Total SCFA and
197 SCFA were calculated as concentrations of acetate + propionate + butyrate and isobutyrate +
198 isovalerate + valerate, respectively. Lactate and fatty acid concentrations were expressed as
199 mmol / g of OM incubated in the fermentation flasks.

200

201 2.6. Chemical analysis

202 Samples of diets, sorghum grains, and reconstituted and ensiled sorghum were ground to a
203 size of 1mm and analyzed according to the Association of Official Analytical Chemists
204 (AOAC, 1997) for DM by drying at 105 °C to constant weight, ash by combustion at 600 °C
205 for 2 h, crude protein by the Kjeldahl method, and ether extract (methods 934.01, 967.05,
206 954.01, and 920.39, respectively). The analysis of the neutral detergent fiber (aNDF) was
207 conducted according to Mertens et al. (2002), using thermostable alpha-amylase and
208 expressed including residual ash, and the acid detergent fiber (ADF) was analyzed according
209 to Method 973.18 of the AOAC (AOAC, 1997). The starch and amylose contents were
210 determined by enzymatic hydrolysis using commercial kits (K-TSTA 07/11 and K-MYL,
211 respectively, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Sorghum grains
212 were also characterized as rapidly digestible starch (RDS, g/kg DM), slowly digestible starch
213 (SDS, g/kg DM), and resistant starch (RS, g/kg DM) according to Englyst et al. (1992). The
214 prolamin extraction was performed according to Hamaker et al. (1995) utilizing t-butanol as
215 precipitating agent. Condensed tannins were determined with the butanol–HCl method as
216 described by Makkar (2000).

217

218 2.6. Statistical analysis

219 Data were tested before statistical analysis to confirm the assumptions of analysis of variance
220 (data normality, homoscedasticity, independence of errors) were met, using the PROC
221 UNIVARIATE procedure (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC). The *in vitro* digestion
222 and fermentation kinetics were analysed using the MIXED procedure of SAS. The DCt and
223 cumulative gas volume values at each specific time were considered depend on the preceding
224 time and analysed as repeated measures, using the incubation time or flask as the subject for

225 the repeated measurement. Then, these parameters were compared between treatments
226 according to the model:

227

$$228 \quad (5) \quad Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + T_k + (G \times T)_{ij} + e_{ijkl}$$

229

230 where μ is the average of the parameter, G_i is the fixed effect of the grain processing type ($i =$
231 dry, reconstituted or ensiled), P_j is the random effect of the plot ($j = 9$ plots, 3 for each grain
232 processing type), T_k is the fixed effect of time ($k = 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360$ and
233 480 min, or 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 h), $(G \times T)_{ij}$ is the interaction between the
234 processing type of the grain and the time and e_{ijk} is the residual error. As the time intervals
235 were not evenly spaced, a covariance structure (SP(POW)) for residuals was applied. The
236 same model was used to analyse SCFA and BCFA production after 24 and 72 h of
237 fermentation, and the mean comparisons were made using the Tukey test. When interactions
238 were significant, simple effects were tested using the “SLICE” option of SAS.

239

240 The remaining data (chemical composition, *in vitro* digestion parameters, starch fractions, HI,
241 *pGI*, and fermentation parameters) were analysed using the MIXED procedure of SAS by the
242 model:

243

$$244 \quad (6) \quad Y_{ij} = \mu + G_i + P_j + e_{ij},$$

245

246 where μ is the average of the parameter, G_i is the fixed effect of the grain processing type ($i =$
247 dry, reconstituted or ensiled), P_j is the random effect of the plot ($j = 9$ plots, 3 for each grain
248 processing type) and e_{ij} is the residual error. Comparisons between means were done by pre-
249 planned orthogonal contrasts, to study the effects of the type of processing of the grain

250 (C1=dry grain vs. fermented grains), and processing methods among them (C2=reconstituted
251 grains vs. ensiled early harvested-grains). For all data, statistical significance was considered
252 at $P < 0.05$ and tendencies at $P < 0.10$.

253

254 **3. Results**

255 3.1. Chemical composition of sorghum grains and experimental diets.

256 When analyzing the chemical composition of the sorghum grains (Table 2), we observed that,
257 as expected, the moisture level of the fermented grains was similar to each other and higher
258 than in the dry grains ($P < 0.001$). The ensiled grains presented a lower EE level and pH
259 values than the reconstituted grains ($P = 0.006$). Kafirin concentrations were higher in ensiled
260 grains than in dry ones and in reconstituted ones ($P = 0.037$). The levels of condensed tannins
261 were low in all the grains, although the lowest levels were registered in the dry ones ($P =$
262 0.049). The starch content was higher in the dry grains than in the reconstituted and ensiled
263 ones ($P = 0.003$), and in turn, the reconstituted grains had a higher starch content than the
264 grains harvested with high humidity and ensiled ($P = 0.024$). Furthermore, the amylose
265 content in the reconstituted grains was lower than in the silage ($P = 0.001$). The starch
266 fractions of the grains were affected by the different treatments, since the dry grains had
267 higher levels of rapidly digestible starch and resistant starch, and lower levels of slowly
268 digestible starch ($P < 0.001$) than the rest. The treated grains presented higher levels of HI and
269 pGI, and higher in vitro digestion coefficients of starch at 240 min of incubation than the dry
270 grains ($P < 0.05$). As expected, the moisture level of the sorghum grains affected the moisture
271 content of the experimental diets (Table 1). However, no differences were observed in the rest
272 of the chemical composition fractions between the three experimental diets, even in the starch
273 level ($P > 0.05$).

274

275 3.2. Starch fractions and *in vitro* starch digestion profile of experimental diets.

276 The experimental diets (Table 3) presented similar contents of total starch, RDS and SDS, but
277 the level of resistant starch was higher in the diet that contained dry grains ($P = 0.008$).

278 Furthermore, the levels of HI and pGI were similar between treatments, presented relatively
279 high values (on average 74.1 and 75.1 respectively), and we only detected that these
280 parameters tended to be lower in the ENS diet than in the REC diet. . When we incubated the
281 experimental diets to evaluate the *in vitro* digestibility of starch, we decided to extend the
282 incubation period to 480 min. In any case, as the starch digestion model did not generate
283 satisfactory parameters, we decided to present the maximum digestion value at 480 min, in
284 addition to 240 min as we did for sorghum grains. The *in vitro* digestibility of starch
285 measured up to 240 min was similar between diets, but we observed that the digestibility after
286 480 min of incubation was higher in the DRY diet than in the diets containing fermented
287 grains ($P = 0.002$). Although the digestion curves presented similar shapes (Figure 1),
288 throughout the entire incubation period we detected differences from minute 20, which
289 suggests that the SEC diet had a higher rate of digestion at the beginning of incubation, for
290 finally stand out from the other two diets. after 360 min.

291

292 3.3. *In vitro* digestion of OM and gas production profile.

293 When pre-digesting the diets using the two-step procedure with pepsin / HCl + pancreatin /
294 amylase (Table 4), we observed that the *in vitro* digestibility of DM in the diets containing
295 fermented grains was 25% higher than in the DRY diet ($P = 0.001$). In addition, the volumes
296 of gas produced were different between treatments, with a higher volume of gas being
297 observed in the experimental DRY diet than in those containing fermented grains ($P < 0.001$).
298 Among the latter, the ENS diet presented a lower volume of gas than REC ($P = 0.006$).
299 Furthermore, the DRY diet took longer to reach the mean time of asymptotic gas production

300 (P <0.001), had a lower maximum gas production rate (P = 0.002) and took longer to reach it
301 (P = 0.001) than the diets containing fermented grains. These differences were evident 4 h
302 after the incubation started (P <0.05, Figure 2).

303

304 3.4. Short-chain and branched-chain fatty acids production during *in vitro* fermentation.

305 The production of short chain and branched chain fatty acids measured in the *in vitro*
306 fermentation flasks differed between treatments and incubation times. For some fatty acids, an
307 interaction was observed between the type of incubated diet and the measurement time (Table
308 5). Acetate production was higher in the ENS treatment than in the others only at 24 h of
309 incubation (slice P = 0.042). At the same time, the amounts of propionate, isovalerate, total
310 SCFA and BCFA recorded at 72 h of fermentation were higher in the DRY treatment than in
311 the other two (Trat × hour, P <0.01). Butyrate levels were lower at 24 h than at 72 h, being
312 lower in the REC treatment than in the others (P = 0.001), and in the same sense, REC
313 presented lower molar proportions of butyrate than the DRY and ENS treatments (P <0.001).

314

315 **4. Discussion**

316 The objective of this work was to compare the *in vitro* digestive utilization of the starch from
317 sorghum grains subjected to different post-harvest treatments when used in the formulation of
318 complete diets for pigs. The treatments are based on the fermentation of harvested grains
319 (through the reconstitution of dry grains or the silage of immature grains) to preserve them
320 while trying to increase their nutritional value. Our original hypothesis was that the starch
321 from silage immature grains would be more digestible than that of mature dry grains and,
322 furthermore, that reconstitution of dry grains would have effects similar to silage from wet
323 grains. For this, we reconstitute the dry harvested grains to the same humidity level as those
324 harvested early. When comparing the moisture contents in the reconstituted grains and in the

325 silage, we observed that this parameter was similar in both treatments (403 vs. 418 g / kg,
326 respectively; P value of the contrast = 0.335; Table 1). Additionally, the pH values measured
327 in these grains were equal to or less than 4, which would indicate a good fermentation process
328 and efficient preservation of the grains. We did not conduct any further evaluations of the
329 silage process, such as aerobic stability.

330

331 Although the starch contents in the grains may vary with the degree of maturity (Kaufman et
332 al., 2017), it seems that as we observed in previous experiments both the reconstitution
333 process and the ensiling of the grains were associated with decreases in starch contents
334 (Brambillasca et al., 2019). The treatments caused modifications in the characteristics of the
335 starch since the fermented grains presented lower levels of fast digesting starch (RDS) and
336 resistant starch (RS), and in turn higher content of slow digesting starch (SDS), that is to say
337 that the anaerobic fermentation process was associated with the degradation of the starch
338 portions most susceptible to microbial attack within the silo (Arcari et al., 2016).

339

340 It has been reported that the fermentation processes of cereal grains such as corn and sorghum
341 are linked to decreases in prolamines content in the endosperm (Arcari et al., 2016; El Khalifa
342 and El Tinay, 1994; Hoffman et al., 2011) generating more favorable conditions for starch
343 degradation. However, in this experiment the effect of the treatments on the kafirin levels of
344 the grains and the different starch fractions were not as expected. The kafirin levels in the
345 beans were remarkably low, and seemed to remain unchanged by the fermentation process.

346 Other authors have reported kafirin concentrations in low tannin sorghum grains in a range of
347 41.4 to 67.1 g / kg, when the crude protein contents of these grains were in a range of between
348 81 to 137 g / kg (Truong et al., 2017). In fact, in our work, the grains with the highest kafirin
349 content were those that were harvested immature and ensiled, which could be associated with

350 lower concentrations of other fractions within the immature grains, eg. starch, relative to dry
351 harvested grains.

352

353 In the same way, if we take into account the condensed tannin content of the grains, we see
354 that the behavior was similar to that of the kafirins, with higher tannin concentrations in the
355 ensiled immature grains than in the dry ones. This could also be explained by differences in
356 concentrations of various components of immature and mature grains. On the other hand, the
357 effect of the fermentation of the grains had no effect on the measured tannin levels, as it was
358 observed in previous experiments (Brambillasca et al., 2019). This could be due to the fact
359 that in this experiment a genotype low in tannins was used, and that the characterization of
360 phenolic compounds was through a method that determines proanthocyanidins (Makkar,
361 2000), a method that perhaps was not specific enough for the characterization of phenolic
362 compounds present in these sorghum grains. In addition, it is possible that the phenolic
363 compounds present in the variety of sorghum used in this study were more resistant to
364 hydrolysis processes (Lopes et al., 2017), or that the concentrations of the phenolic
365 compounds detected were already at a maximum level in stages. initial development of grains
366 in the crop.

367

368 On the other hand, the higher content of resistant starch in dry sorghum grains indicates a
369 higher content of physically inaccessible or trapped starch within the granules (Englyst et al.,
370 1992; Sun et al., 2006), which appears to be reduced with the reconstitution and silage
371 processes. In the same sense, the fermented grains presented greater starch digestion at minute
372 240, and higher HI and pGI values than the dry grains, being similar to those observed in the
373 reconstituted grains analyzed in Experiment 1. The levels of pGI In the fermented grains in
374 the present study they were high (pGI \geq 70), while the dry grains had medium values (pGI:

375 56 to 70) taking into account data reported in previous studies (Giuberti et al., 2012a).
376 Considering these variables, it seems that the silage and reconstitution processes generated a
377 positive impact on the grains, since in pigs, foods with high glycemic indices are associated
378 with higher postprandial glucose responses (Giuberti et al., 2012b), higher levels high insulin
379 secretion (Regmi et al., 2010), as well as greater daily weight gains and greater retention of
380 lean tissue (Drew et al., 2012).

381

382 When evaluating the starch fractions and in vitro digestion parameters of the complete diets
383 containing sorghum grains (Table 3; Figure 1), we observed responses that we initially did not
384 expect. The experimental diets differed only in the content of resistant starch, being higher in
385 the DRY diet than in the other two, following the same sense of the results observed in the
386 grains incubated alone. However, when measuring the in vitro digestibility of starch during
387 the 480 min of incubation we observed that the treatments behaved in a similar way up to 240
388 min and that at the end of the incubation period the treatment containing the dry grains (DRY)
389 presented higher digestibilities of starch than the diet containing ensiled grains (ENS). In
390 addition, if we consider the digestibility of starch at each individual measurement point, we
391 observe that at 20 min of incubation, the DRY diet was the one that presented the highest
392 digestibility of starch, which is related to its content in grains that had a higher level of starch.
393 fast digestion. On the other hand, the in vitro digestion of starch recorded for the three diets
394 was relatively high, and with high HI and pGI values for diets formulated based on sorghum
395 grains (Giuberti et al., 2012a). Possibly, the high starch digestibility of this sorghum genotype
396 could mask important impacts previously expected when ensiling or reconstituting the grains.
397 Likewise, it seems that in this type of sorghum genotype with low tannin content and low
398 relative prolamin content, treatments that aim to improve the digestive use of starch through

399 silage or reconstitution of the grains may be unnecessary or even counterproductive, since
400 these fermentation processes can consume the most degradable fractions of starches.
401
402 The higher volumes of gas recorded when we incubated the pre-digestion residue with fresh
403 feces of piglets that consumed the DRY diet are the result of the lower in vitro digestibilities
404 of OM observed for this treatment (Table 4). In this experiment, when we incubated fecal
405 matter without substrate in the in vitro fermentation flasks (fermentation blanks) we observed
406 differences in the volumes of accumulated gas, being the inoculum from the SEC treatment
407 the one that produced the most gas, followed by REC and finally ENS ($P < 0.001$). This
408 indicates that higher amounts of fermentable substrates such as eg. resistant starch, reached
409 the large intestine in piglets fed DRY, although considering the high starch digestibilities
410 observed in ileum, other substrates such as fermentable fiber or even amino acids could be
411 involved (De Schrijver et al., 1999; Suarez-Belloch et al., 2013). On the other hand, the pre-
412 digestion residue of the diet with ensiled grains (ENS) seems to have had a lower content of
413 fermentable substrates, which denotes a greater use of digestible nutrients, including starch, in
414 previous sections of the gastrointestinal tract. If we compare the diets formulated with
415 fermented sorghum (REC and ENS) with the DRY diet, it seems that the fermentation process
416 generates favorable conditions for a greater digestion of starch and other nutrients (A. B. R. C.
417 Lopes et al., 2017; Mitaru et al., 1984a) Furthermore, the fermentable substrates in the REC
418 and ENS treatments were readily available to the microbiota and fermented faster, while the
419 fermentation in the DRY treatment reached comparable gas volumes 10 h after the incubation
420 started (Fig. 2). Probably, the variations observed in the fermentation kinetics could be due to
421 differences in the RS content in the different grains used in the experimental diets.

422

423 The differences observed in the in vitro fermentation parameters were reflected in the
424 production of SCFA and BCFA measured after 24 and 72 h of incubation (Table 5). In fact,
425 the SEC treatment was the one that generated the highest amount of total SCFA, BCFA,
426 propionate as well as the highest volumes of gas produced. The production of SCFA is related
427 to the amount and type of fermentable substrates that reach the large intestine and are the
428 main end product of the fermentation of the microbiota (Calabrò et al., 2012). In addition,
429 although the chemical composition of the pre-digested diets is not presented, possibly the pre-
430 digested DRY diet has had a higher fraction of CP, which is associated with a greater
431 fermentation of branched chain amino acids that causes a greater production of BCFA (Regmi
432 et al., 2011; Ying et al., 2013). SCFAs have a trophic effect on the intestinal epithelium,
433 maintaining the integrity of the mucosa against pathogens (Calabrò et al., 2012), butyrate
434 being of special interest because it is a source of energy and stimulant of enterocyte mitosis
435 (Claus et al., 2007; Giuberti et al., 2014b). Although the DRY treatment generated more
436 favourable conditions for fermentation as it was formulated with grains with a higher RS
437 content, this was not conclusive in terms of butyrate production, since similar amounts were
438 produced with the SEC and ENS diets.

439

440 **5. Conclusion**

441 The reconstitution and ensiling processes caused some modifications in the chemical
442 composition of grains, in terms of losses of some fractions of fast-digesting starch, but
443 presenting lower levels of resistant starch. When evaluating the complete diets, the effects
444 observed in the grains alone were not evident. The high digestibility of starch in the diets,
445 considering the genotype of sorghum grain used in the study, indicates that the treatments
446 conducted on grains were unnecessary to improve the digestive use of nutrients. Although the
447 starch digestion of the complete diets was not modified as we initially expected, some

448 changes in the final fermentation products, especially in the diet with higher RS content, may
449 be related to healthier intestinal conditions.

450

451 **Acknowledgments**

452 This work was supported by the ANII - FMV_1_2017_1_136157 project “Evaluation of diets
453 containing high tannin sorghum grain on the digestion and meat quality in pigs”.

454

455 **References**

- 456 Adams, R.F., Jones, R.L., Conway, P.L., 1984. High-performance liquid chromatography of
457 microbial acid metabolites. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 336, 125–137.
458 [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85136-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85136-1)
- 459 Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination, ensiling
460 and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 75–
461 81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>
- 462 Arcari, M.A., Martins, C.M. de M.R., Tomazi, T., Santos, M.V. dos, 2016. Effect of the ensiling
463 time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability.
464 *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 60. [https://doi.org/10.11606/issn.1678-
465 4456.v53i1p60-71](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71)
- 466 Bauer, E., Williams, B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2001. Microbial
467 activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable
468 carbohydrates. *Anim. Sci.* 73, 313–322. <https://doi.org/10.1017/S135772980005829X>
- 469 Brambillasca, S., Fernández–García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019.
470 Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry
471 sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.*
472 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

473 Brambillasca, S., Fernández–García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019b.
474 Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry
475 sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.*
476 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

477 Brambillasca, S., Zunino, P., Cajarville, C., 2015. Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in
478 diets for piglets: Influence on nutritional and faecal parameters, intestinal organs, and
479 colonic fermentation and bacterial populations. *Livest. Sci.* 178, 243–250.
480 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.003>

481 Calabrò, S., Carciofi, A.C., Musco, N., Tudisco, R., Gomes, M.O.S., Cutrignelli, M.I., 2012.
482 Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro
483 gas production technique. *Ital. J. Anim. Sci.* 12, 21–27.
484 <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e4>

485 Claus, R., Günthner, D., Letzguß, H., 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal
486 morphology and function in the small intestine of the pig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*
487 (Berl). 91, 312–318. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00655.x>

488 Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H., De Lange, L., 2005. Estimation of protein
489 fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. *Anim. Feed*
490 *Sci. Technol.* 123-124 Pa, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.020>

491 De Schrijver, R., Vanhoof, K., Vande Ginste, J., 1999. Effect of enzyme resistant starch on
492 large bowel fermentation in rats and pigs. *Nutr. Res.* [https://doi.org/10.1016/S0271-](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00053-6)
493 [5317\(99\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00053-6)

494 Drew, M.D., Schafer, T.C., Zijlstra, R.T., 2012. Glycemic index of starch affects nitrogen
495 retention in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 1233–1241. [https://doi.org/10.2527/jas.2010-](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3458)
496 [3458](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3458)

497 El Khalifa, A.O., El Tinay, A.H., 1994. Effect of fermentation on protein fractions and tannin

498 content of low- and high-tannin cultivars of sorghum. *Food Chem.* 49, 265–269.
499 [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90171-6)

500 Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H., 1992. Classification and measurement of
501 nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* [https://doi.org/10.1111/j.1750-](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x)
502 [3841.2010.01627.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x)

503 FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (2013). *Necesidades*
504 *Nutricionales para Ganado Porcino: Normas FEDNA (Segunda Edición ed.)*. FEDNA.
505 Madrid, España.

506 Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Masoero, F., 2012. In vitro starch digestion and predicted
507 glycemic index of cereal grains commonly utilized in pig nutrition. *Anim. Feed Sci.*
508 *Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.006>

509 Giuberti, G, Gallo, A., Masoero, F., 2012. Plasma glucose response and glycemic indices in
510 pigs fed diets differing in in vitro hydrolysis indices. *animal* 6, 1068–1076.
511 <https://doi.org/10.1017/S1751731111002345>

512 Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., Ferraretto, L.F., Hoffman, P.C., Shaver, R.D., 2014.
513 Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review.
514 *Starch/Staerke.* <https://doi.org/10.1002/star.201300177>

515 Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B. a., Debersaques, F.M. a., Lantinga, E. a., 1996.
516 Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds.
517 *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)

518 Hamaker, B.R., Mohamed, A.A., Habben, J.E., Huang, C.P., Larkins, B.A., 1995. Efficient
519 procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin
520 contents than the conventional method. *Cereal Chem.* 72, 583–588.

521 Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G.A., Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994.
522 Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.*

523 <https://doi.org/10.2527/1994.7292227x>

524 Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt,
525 R.J., Charley, R.C., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the
526 starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, 2465–2474.
527 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3562>

528 Jha, R., Fouhse, J.M., Tiwari, U.P., Li, L., Willing, B.P., 2019. Dietary fiber and intestinal
529 health of monogastric animals. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–12.
530 <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00048>

531 Kaufman, R.C., Wilson, J.D., Bean, S.R., Xu, F., Shi, Y.C., 2017. Sorghum starch properties
532 as affected by growing season, hybrid, and kernel maturity, *Journal of Cereal Science*.
533 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.014>

534 Kim, I.H., Hancock, J.D., Kim, J.H., Kennedy, G.A., Hines, R.H., Behnke, K.C., Nichols, D.A.,
535 2002. Processing procedures and feeding systems for sorghum-based diets given to
536 lactating sows. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15, 1186–1190.
537 <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1186>

538 Liu, S., Fox, G., Khoddami, A., Neilson, K., Truong, H., Moss, A., Selle, P., 2015. Grain
539 Sorghum: A Conundrum for Chicken-Meat Production. *Agriculture* 5, 1224–1251.
540 <https://doi.org/10.3390/agriculture5041224>

541 Lopes, A.B.R.C., Tse, M.L.P., de Silva, A.M.R., Neto, M.A.T., Pereira, C.S., Saleh, M.A.D.,
542 Berto, D.A., 2017. High-moisture sorghum grain silage with low-and high-tannin contents
543 for weanling piglets. *Cienc. Rural.* <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>

544 Makkar, H.P.S., 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. *FAO/IAEA Working*
545 *Document.* IAEA, Vienna, Austria

546 McCuiston, K.C., Selle, P.H., Liu, S.Y., Goodband, R.D., 2018. Sorghum as a feed grain for
547 animal production, *Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional*

548 Attributes. AACCI. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00012-5>

549 Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K.,
550 Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D.,
551 Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex,
552 N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral
553 detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. J.
554 AOAC Int. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>

555 Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984. Nutritive Value Of Reconstituted Sorghum Grains
556 For Weanling Pigs. J. Anim. Sci. <https://doi.org/10.2527/jas1984.5851211x>

557 Owsley, W.F., Knabe, D.A., Tanksley, T.D., 1981. Effect of sorghum particle size on
558 digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-
559 finishing pigs. J. Anim. Sci. 52.
560 <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas1981.523557x523557x>

561 Poelaert, C., Nollevaux, G., Boudry, C., Taminiau, B., Nezer, C., Daube, G., Schneider, Y.J.,
562 Portetelle, D., Théwis, A., Bindelle, J., 2017. Reducing agent can be omitted in the
563 incubation medium of the batch in vitro fermentation model of the pig intestines. Animal
564 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002749>

565 Regmi, P.R., Matte, J., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2010. Starch chemistry affects
566 kinetics of glucose absorption and insulin response in swine. Livest. Sci. 134, 44–46.
567 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.092>

568 Regmi, P.R., Metzler-Zebeli, B.U., Ganzle, M.G., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2011.
569 Starch with High Amylose Content and Low In Vitro Digestibility Increases Intestinal
570 Nutrient Flow and Microbial Fermentation and Selectively Promotes Bifidobacteria in
571 Pigs. J. Nutr. 141, 1273–1280. <https://doi.org/10.3945/jn.111.140509>

572 Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., de Oliveira, R.F., Lopes, D.C.,

573 Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R., 2017. Tabelas brasileiras para suínos e aves,
574 Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.
575 Stevnebø, A., Sahlström, S., Svihus, B., 2006. Starch structure and degree of starch hydrolysis
576 of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content.
577 *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.015>
578 Suarez-Belloch, J., Doti, S., Rodríguez-Romero, N., Guada, J.A., Fondevila, M., Latorre, M.A.,
579 2013. Hindgut fermentation in pigs induced by diets with different sources or starch.
580 *Spanish J. Agric. Res.* 11, 780–789. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013113-3958>
581 Sun, T., Lærke, H.N., Jørgensen, H., Knudsen, K.E.B., 2006. The effect of extrusion cooking
582 of different starch sources on the in vitro and in vivo digestibility in growing pigs. *Anim.*
583 *Feed Sci. Technol.* 131, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.02.009>
584 Truong, H.H., Neilson, K.A., McInerney, B. V., Khoddami, A., Roberts, T.H., Cadogan, D.J.,
585 Liu, S.Y., Selle, P.H., 2017. Comparative performance of broiler chickens offered
586 nutritionally equivalent diets based on six diverse, “tannin-free” sorghum varieties with
587 quantified concentrations of phenolic compounds, kafirin, and phytate. *Anim. Prod. Sci.*
588 57, 828–838. <https://doi.org/10.1071/AN16073>
589 van Kempen, T.A.T.G., Regmi, P.R., Matte, J.J., Zijlstra, R.T., 2010. In Vitro Starch Digestion
590 Kinetics, Corrected for Estimated Gastric Emptying, Predict Portal Glucose Appearance
591 in Pigs. *J. Nutr.* 140, 1227–1233. <https://doi.org/10.3945/jn.109.120584>
592 Ying, X., Gong, J., Goff, H.D., Yu, H., Wang, Q., Cui, S.W., 2013. Effects of pig colonic digesta and
593 dietary fibres on in vitro microbial fermentation profiles. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre.*
594 <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.03.002>
595

596 Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets.

	DRY	REC	ENS
<i>Ingredients (g/kg DM)</i>			
Dry grain	619	–	–
Reconstituted grain	–	619	–
Ensiled grain	–	–	619
Animal plasma	44	44	44
Extruded soybean	245	245	245
Soybean oil	36	36	36
Monocalcium phosphate	13	13	13
Calcium carbonate	10	10	10
Salt	17	17	17
Vitamin-mineral mix ^a	5	5	5
L-Lysine	4.5	4.5	4.5
DL-Methionine	2	2	2
L-Threonine	3.5	3.5	3.5
Mycotoxin adsorbent ^b	1	1	1
<i>Analyzed nutrient composition (g/kg DM)^c</i>			
Dry mater	897 ± 2.8	709 ± 16.8	693 ± 24.8
Ash	68.9 ± 3.32	74.3 ± 8.14	83.3 ± 7.00
Organic matter	931 ± 3.3	926 ± 8.1	917 ± 7.0
Crude protein	224 ± 20.2	218 ± 10.6	220 ± 14.6
Neutral detergent fibre	93.8 ± 13.30	84.8 ± 19.45	96.7 ± 15.42
Acid detergent fibre	64.3 ± 8.59	62.8 ± 13.26	70.9 ± 11.33
Hemicelluloses	29.5 ± 6.10	22.0 ± 6.52	25.8 ± 9.57
Starch	361 ± 14.8	370 ± 34.0	349 ± 20.4
Ether extract	75.8 ± 3.60	79.2 ± 8.38	80.3 ± 9.34
Metabolizable energy, (kcal/kg) ^d	3711	3705	3596

597 ^aSupplied per kg of feed: Vit. A, 34,000 IU; Vit. E, 204 IU; Vit D3, 6,800 IU; Vit. K, 15 mg;
598 thiamin (Vit. B1), 4.7 mg; riboflavin (Vit. B2), 18.5 mg; piridoxin (Vit. B6), 9.9 mg; Vit. B12,
599 0.10mg; panthotenic acid, 69.7 mg; choline, 980 mg; niacin, 146 mg; folic acid, 1.6 mg;
600 biotin, 0.5 mg; Mn, 151 mg; Se, 1.3 mg; Cu, 50 mg; Fe, 403 mg; Zn, 390 mg; I, 4.7 mg. ^bFree-
601 Tox, Nutrex, Belgium. ^cData are presented as means ± standard deviation (n=3). ^dCalculated
602 according to Noblet and Pérez (1993).
603

604 Table 2. Chemical composition (g/kg DM), pH, amylose content (g/100 g of starch) and starch
 605 fractions (g/kg DM) of dry, reconstituted and ensiled sorghum grains.

	Grain processing ^a			SEM ^b	Contrasts ^c (P-value)	
	Dry	Reconst.	Ensiled		C1	C2
pH	–	4.01	3.91	0.021	–	0.006
Dry matter	888	597	582	8.8	<0.001	0.335
Ash	20.8	21.2	27.2	2.36	0.260	0.094
Organic matter	979	979	973	3.7	0.478	0.299
Crude protein	128	126	124	2.0	0.308	0.562
Neutral detergent fibre	140	122	137	11.0	0.456	0.353
Acid detergent fibre	77.7	66.8	75.4	6.00	0.386	0.329
Hemicelluloses	62.5	55.6	61.9	5.86	0.608	0.455
Ether extract	38.2	41.3	36.7	1.03	0.547	0.006
Kafirins	33.5	32.9	45.2	3.79	0.248	0.037
Kafirins. % of CP	26.2	26.0	36.1	2.77	0.163	0.019
Condensed tannins	0.12	0.20	0.35	0.058	0.049	0.098
Starch	614	586	553	12.8	0.013	0.086
Amylose	24.0	20.1	24.5	0.73	0.079	0.001
<i>Starch fractions</i>						
RDS ^d	129	56.2	30.5	9.90	<0.001	0.086
SDS ^e	195	348	351	19.3	<0.001	0.940
RS ^f	289	181	172	20.1	<0.001	0.735
HI ^g	65.1	74.3	69.4	2.30	0.029	0.150
pGI ^h	65.9	75.3	70.3	2.33	0.029	0.150
DCt ₂₄₀ ⁱ	0.712	0.836	0.878	0.0278	0.001	0.297

606 ^aDry: sorghum grains harvested mature and stored as dry whole grain; Reconst.: sorghum grains
 607 harvested mature, ground and reconstituted; Ensiled: grains harvested in an immature stage, ground
 608 and ensiled. ^bstandard error of the mean (n=3). ^cContrasts: C1 = Dry vs. fermented grains (Reconst. +
 609 Ensiled); C2 = Reconst. vs. Ensiled. ^dRapidly digestible starch (g/kg DM). ^eSlowly digestible starch
 610 (g/kg DM). ^fResistant starch (g/kg MS). ^gHydrolysis index, calculated using white bread as reference
 611 (HI=100). ^hPredicted glycaemic index, calculated according to Giuberti et al. (2012a). ⁱIn vitro
 612 digestion coefficient of starch at 240 min of incubation (DCt₂₄₀).

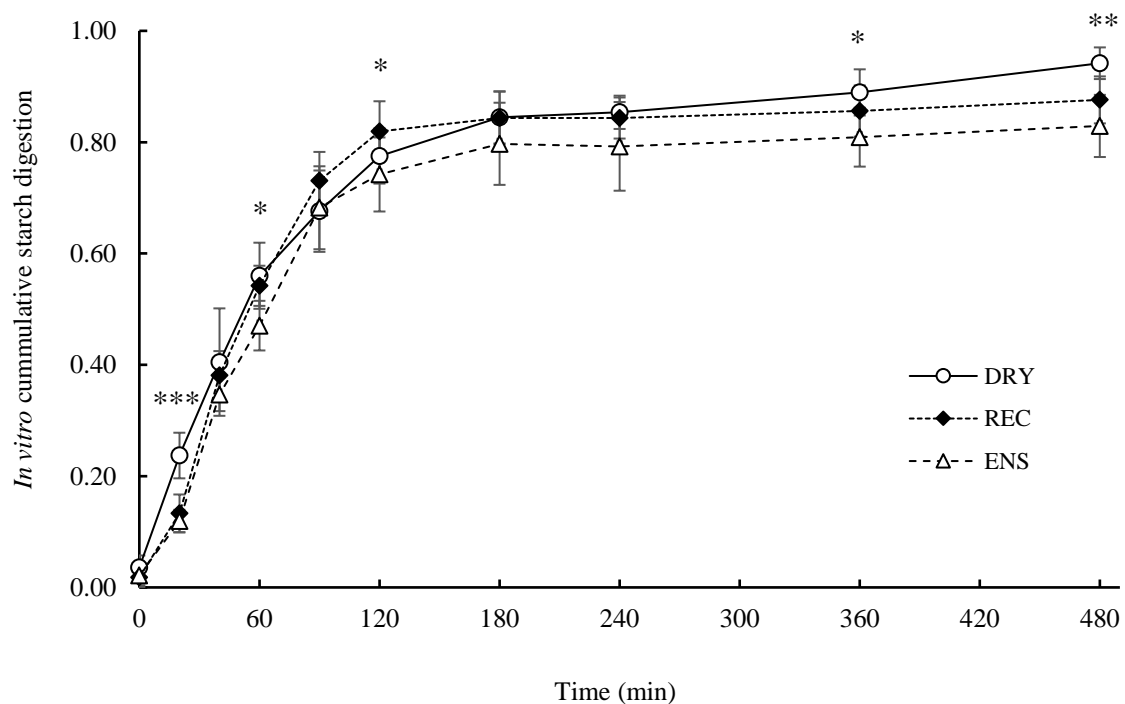
613
614
615
616
617

Table 3. Starch fractions, hydrolysis index (HI), predicted glycaemic index (*pGI*), parameters of digestion and *in vitro* digestion coefficient of starch (DCt) at 240 and 480 min of incubation of experimental diets.

	Treatment ^a			SEM ^b	Contrasts ^c (P-value)	
	DRY	REC	ENS		C1	C2
TS, g/kg DM	361	370	349	10.8	0.876	0.189
RDS ^d , g/kg DM	53.3	40.8	53.2	8.69	0.559	0.327
SDS ^e , g/kg DM	201	249	217	15.7	0.111	0.162
RS ^f , g/kg DM	107	79.6	78.8	7.49	0.008	0.946
HI ^g	76.7	76.9	68.8	3.12	0.326	0.086
<i>pGI</i> ^h	77.7	77.9	69.7	3.17	0.326	0.086
DCt ₂₄₀	0.854	0.843	0.792	0.0240	0.243	0.153
DCt ₄₈₀	0.942	0.876	0.829	0.0195	0.002	0.110

618 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum
619 grain; ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
620 (n=3/treatment). ^cContrast: C1=DRY vs. diets including fermented grains (reconstituted + ensiled);
621 C2=REC vs. ENS. ^dRapidly digestible starch (g/kg DM). ^eSlowly digestible starch (g/kg DM).
622 ^fResistant starch (g/kg MS). ^gCalculated using white bread as reference (HI=100). ^hCalculated
623 according to Giuberti et al. (2012a).

624
625

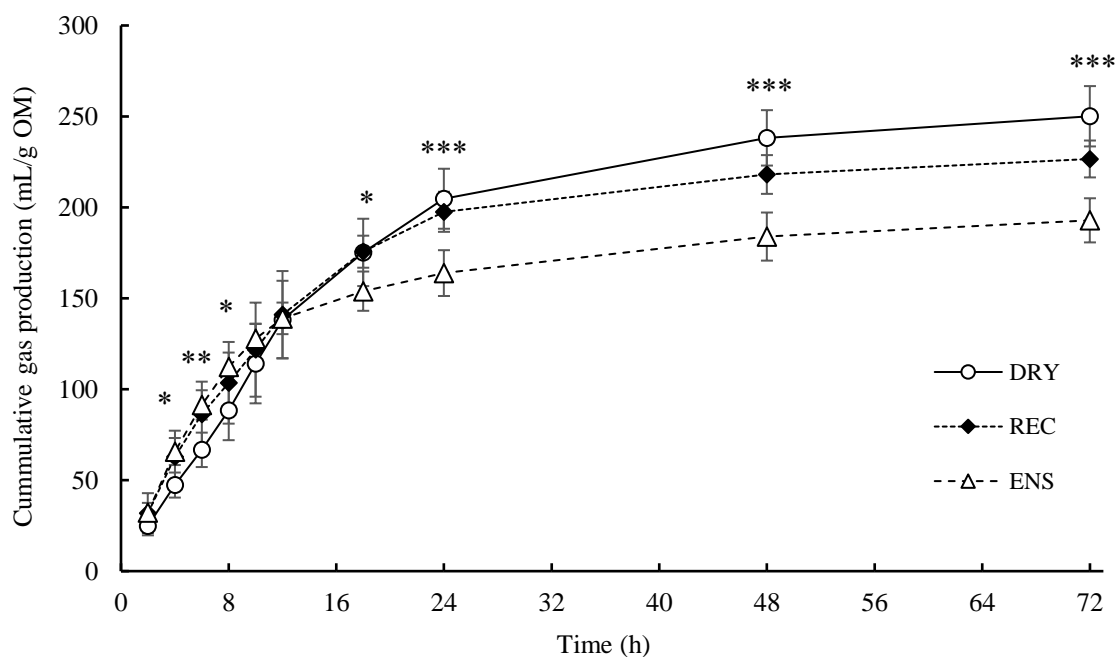


626
627 Figure 1. Elapsed time of the average accumulated digestion of starch (as a fraction of total
628 starch) for experimental diets. For each time point, asterisks indicate at least one significant
629 difference (*P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001) among treatments. Values are means (n = 3,
630 ± s.d.). Values are means (n=3, ± s.d.).

631 Table 4. *In vitro* digestion of OM and fermentation parameters of pre-digested experimental diets
 632 incubated with faecal digesta from piglets.
 633

	Treatment ^a			SEM ^b	Contrast ^c (P-value)	
	DRY	REC	ENS		C1	C2
IV Digest of OM ^d	46.75	59.03	57.97	1.257	0.001	0.571
OMCV (mL/g OM) ^e	260.1	231.9	200.0	11.65	<0.001	0.006
A (mL/g OM) ^f	289.4	249.0	211.5	13.88	<0.001	0.004
T _{1/2} (h) ^g	12.4	8.2	6.8	1.61	<0.001	0.140
R _{max} (mL/h) ^h	14.0	18.7	18.3	0.98	0.002	0.821
T _{max} (h) ⁱ	3.4	2.0	1.5	0.38	0.001	0.397

634 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum
 635 grain; ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
 636 (n=9). ^cContrast: C1=DRY vs. fermented grains (reconstituted + ensiled); C2=REC vs. ENS. ^d*In vitro*
 637 digestion of OM by incubation with pepsin-HCl and pancreatin (Cone et al., 2005). ^eOMCV: volume
 638 of accumulated gas. ^gA: asymptotic gas production. ^hT_{1/2}: half-time of the asymptotic gas
 639 production; ⁱR_{max}: maximal rate of gas production. ^jT_{max}: time of occurrence of R_{max}.



665 Figure 2. Pattern of *in vitro* gas production (mL/g OM incubated) for diets formulated with dry
 666 (DRY), reconstituted (REC) or ensiled high moisture (ENS) sorghum grains. For each time point,
 667 asterisks indicate at least one significant difference (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001) among
 668 treatments. Values are means (n = 3, ± s.d.).

669 Table 5. Lactate, short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) production
 670 (mg/g OM) and molar proportions (%) of acetate, propionate and butyrate when pre-digested
 671 experimental diets were incubated *in vitro* for 24 or 72 h with faeces from piglets fed the experimental
 672 diets.
 673

	Treatment ^a						SEM ^b	P-values		
	DRY		REC		ENS			Treat	time	Treat×time
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h				
<i>mmol/g OM incubated</i>										
Lactate	0.90	1.29	1.41	1.31	1.75	1.52	0.304	0.222	0.932	0.552
Acetate	131 ^y	175	139 ^y	168	158 ^x	167	10.6	0.148	<0.001	0.004
Propionate	71.7	91.3 ^x	71.3	78.5 ^y	70.6	75.1 ^y	2.46	0.001	<0.001	0.004
Butyrate	32.4	42.1	25.9	30.7	33.1	33.9	4.05	0.001	0.012	0.183
Isobutyrate	3.33 ^y	5.34	2.95 ^y	4.42	5.25 ^x	4.51	0.512	0.062	0.027	0.019
Valerate	10.4	16.6	11.4	10.6	8.12	8.98	2.02	0.059	0.216	0.184
Isovalerate	7.39	12.9 ^x	6.74	9.68 ^y	7.93	9.48 ^y	2.04	0.014	<0.001	0.018
Total SCFA	235	309 ^x	236	277 ^y	262	276 ^y	16.0	0.125	<0.001	0.002
BCFA	21.2	39.9 ^x	21.3	24.8 ^y	21.7	23.1 ^y	3.16	0.048	0.004	0.036
<i>Molar proportion (%)</i>										
Acetate (%)	55.8	56.9	58.8	60.5	60.2	60.5	0.88	<0.001	0.136	0.669
Propionate (%)	30.8	29.7	30.3	28.6	27.0	27.2	1.23	<0.001	0.076	0.270
Butyrate (%)	13.4	13.5	10.9	10.9	12.6	12.3	0.89	<0.001	0.883	0.954

674 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum
 675 grain; ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
 676 (n=3). ^{x,y}Within a row different superscripts indicate significant differences among treatments (P <
 677 0.05).
 678

679 **Digestion of nutrients, nitrogen retention and hindgut fermentation of diets for piglets**
680 **containing dry, reconstituted, or ensiled sorghum grains.**

681 Sebastián Brambillasca ^a, Marina Fernández–García ^a, Nadia Wasem ^a, Cecilia Cajarville ^a,
682 José Luis Repetto ^a.

683 ^a Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la
684 República, Ruta 1, km 42,500, Libertad, San José,

685

686 **ABSTRACT**

687 The effect of including dry, reconstituted or ensiled sorghum grains in complete diets for
688 piglets on digestive and metabolic utilization of nutrients, and on final fermentation products
689 in the hindgut was evaluated. Sorghum grains from a single crop were harvested, and
690 complete diets were formulated with dry grains (DRY), reconstituted (REC) and ensiled
691 (ENS) grains. Diets were fed to 27 piglets housed in metabolic cages, under a randomized
692 block design. Feed intake in piglets fed DRY was higher than those that received diets with
693 fermented grains ($P = 0.003$), while those who received ENS had a higher feed intake than the
694 REC group ($P = 0.021$). The apparent digestibility of CP tended to be lower in the ENS than
695 in the REC diet ($P = 0.051$), the DRY diet presented a higher digestibility of fibre than the
696 diets containing fermented grains ($P < 0.05$), and the apparent ileal digestibility of starch was
697 similar between the three diets. N retained and the relationship between N retained and
698 consumed were high (average: 0.73) and similar between treatments. Concentrations of
699 isovalerate, BCFA and molar proportions of butyrate were higher in the hindgut digesta of
700 piglets fed DRY and ENS than in those receiving REC ($P < 0.05$). The high digestibility of
701 starch in the diets, considering the genotype of sorghum grain used in the study, indicates that
702 the treatments conducted were not necessary to improve the digestive use of nutrients. There
703 seems to be a high synchrony between starch digestion and proteins that resulted in high N

704 retention. The production of organic acids reflected the profile of fermentable substrates,
705 which was based on resistant starch and to a lesser extent on amino acids, which may be
706 related to better intestinal health conditions.

707

708 **Keywords**

709 Sorghum grain silage; Starch digestion; N utilization; Short-chain fatty acids; Intestine; Pig

710

711 **1. Introduction**

712 Cereal grains are the main source of energy in diets for monogastric species. One of the
713 cereals most used in animal feed is sorghum grain, mainly as a source of energy. However,
714 the use of nutrients and energy from this cereal can be problematic when compared to other
715 cereals such as corn (Liu et al., 2013). A characteristic of sorghum is that its nutritional value
716 is closely related to the genotype of the grain and the processing that is carried out on it. The
717 differences between genotypes are given by the presence to a greater or lesser extent of
718 kafirins, phenolic compounds and phytates, which are three factors responsible for the sub-
719 optimal utilization of starch and grain energy (Liu et al., 2015).

720

721 Kafirins are poorly soluble proteins present in the endosperm of the grain that limit the
722 digestion of starch, phenolic compounds such as tannins, form indigestible complexes with
723 proteins and starches, while phytates can limit the intestinal absorption of P, glucose and
724 amino acids (McCuiston et al., 2018). According to data published in food tables for pigs, it
725 is observed that the energy value of sorghum grains high and low in tannins correspond to 88
726 to 99%, respectively, of the energy value of corn (Rostagno et al., 2017). Regarding the type
727 of processing, increases in the digestive use of sorghum grains have been reported through
728 grinding (B. J. Healy et al., 1994; Owsley et al., 1981), extrusion (Kim et al., 2002),

729 reconstituted (M Aguerre et al., 2015; Mitaru et al., 1984a) or grain silage (A. B. R. de C.
730 Lopes et al., 2017a), being associated in some of these treatments with a decrease in the
731 content of tannins or modifications in the protein matrix of the grain.

732

733 In previous experiments we had evaluated the potential intestinal digestion of starch from pig
734 diets containing reconstituted or ensiled sorghum grains using in vitro methods (Brambillasca
735 et al., 2019b). Subsequently, we considered studying the impact of these treatments when
736 ensiled or reconstituted sorghum grains are included in diets for pigs, since we hypothesized
737 that treatments that involve the fermentation of sorghum grains will be related to changes in
738 the digestive use of nutrients in pigs. Therefore, the objective of this study was to evaluate the
739 digestive use of nutrients and possible variations in fermentation products in the hindgut of
740 piglet diets containing reconstituted and ensiled sorghum grains.

741

742 **2. Materials and methods**

743 All procedures were approved by the Bioethics Committee of Facultad de Veterinaria
744 (UdelaR; Protocol number CEUAFVET-488). The experiment was conducted at the
745 Experimental Farm of Facultad de Veterinaria (San José Department, Uruguay; 34°41'S,
746 56°32'W).

747

748 **2.1. Grain harvest and storage**

749 For this study, a crop of a sorghum grain cultivar a grain cultivar (Flash 10, red grain, low in
750 tannins, from IPB[®], San José, Uruguay) was used. The crop was divided into 9 plots of 30 ×
751 30 m each, and plots were randomly selected to be harvested at two different times: the grains
752 from 3 plots were harvested in an immature state and with a moisture content of 40%, while
753 the grains from the remaining 6 plots were harvested in a mature state with a moisture content

754 of 12%. The grains harvested with high moisture content were ground using a grinder (JF 2D,
755 JF Máquinas Agrícolas Ltda, Itapira, SP, Brasil) with a 3.0 mm sieve, and immediately stored
756 stored and compacted in 200 L plastic barrels, hermetically closed to preserve anaerobiosis.
757 Grains from 3 plots harvested in a mature state were ground and reconstituted, adding enough
758 water to reach a moisture content of 40%, and immediately stored under anaerobic condition
759 in 200 L plastic barrels. The grains from the 3 remaining plots were stored as whole dry grain
760 in identical plastic barrels. The grains from each of the original crop plots were stored in
761 different barrels to preserve the previously defined random plot scheme.

762

763 2.2. Animals and experimental procedures.

764 Twenty-seven castrated crossbreed male piglets (Landrace × Large White) of 45 days of age
765 (initial BW 8.60 ± 1.88 kg) from a commercial pig farm were used in the study. Piglets were
766 individually allocated in metabolic crates (0.9×1.2 m²), blocked by weight and assigned to
767 one of three treatments. Treatments consisted in diets based on dry sorghum grain (DRY),
768 reconstituted sorghum grain (REC), and ensiled high moisture sorghum grains (ENS), made
769 from the grains harvested from the 9 plots mentioned above. Diets were formulated following
770 recommendations proposed by FEDNA (2013) and included the same level of sorghum on a
771 dry matter basis (Table 1). To maintain the random plot design followed in the crop, 3
772 animals received diets containing the grains harvested from each plot. In this way, each
773 treatment was consumed by nine animals, with three animals replicates each. The extent of
774 the experiment was 24 days in total, with eight days of adaptation to the experimental
775 conditions and a measurement period of 16 days. The animals had free access to diet and
776 running water throughout the experiment.

777

778 The weight of the animals was recorded every 5 days, and feed consumption was recorded
779 daily by weighing the amount of feed offered and rejected. The totality of the feces and urine
780 excreted by each piglet was measured between days 8 and 13. The feces were individually
781 weighed daily, pH and fecal consistency were recorded, and a daily aliquot was kept at -20°C
782 until analysis to determine the apparent digestibility of nutrients. Fecal pH was determined
783 with a digital pH meter (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapore) by diluting 5 g of
784 fresh feces in 50 mL of distilled water. Fecal consistency was scored using a scale of 1 (firm
785 stool) to 4 (watery stool) as described by Freitas et al. (2006). From day 19 of the experiment,
786 Cr₂O₃ (2.5 g / kg, according to van Leeuwen et al., 1996) was included in the diets as an
787 indigestible marker to determine the ileal digestibility of starch. The last two days of the
788 experiment (day 23 and 24) the animals were desensitized by electrical stunning and
789 sacrificed by exsanguination following the order of blocks and treatments. Half the animals
790 were euthanized on day 23 and the other half on day 24 to simplify the handling and sampling
791 process. The sample collection process was conducted on one animal at a time, and the entire
792 procedure had an average duration of 15 minutes. The gastrointestinal tract of each animal
793 was removed immediately after sacrifice and the segments (stomach, duodenum, jejunum-
794 ileum, cecum and colon) were identified and ligated before being separated. Digesta samples
795 were taken from the ileum, cecum, and the middle colon for pH measurement. Besides, the
796 entire content of the ileum of each animal was collected in plastic tubes and stored at -20°C to
797 determine the ileal digestibility of starch. Individual samples of the cecum and colon digesta
798 were kept at -20°C in plastic bags to determine the concentration of organic acids in these
799 sectors of the large intestine.

800

801 2.3. Organic acids analysis

802 Digesta from caecum and colon were thawed, 3 g were taken and homogenized in a
803 Stomacher (Lab Blender 80, Tekmar Co., Cincinnati, USA) for 2 min in 30 mL of a 0.15
804 mmol/L H₂SO₄ solution prepared with ultrapure water, and 2 mL of the supernatant was
805 centrifuged at 9000 × g at 2 ° C for 20 min, according to Chen and Lifschitz (1989). The
806 diluted and centrifuged digesta samples were placed in vials and analyzed for fatty acid and
807 lactate content. The concentrations of lactate and short chain fatty acids (SCFA) and branched
808 (BCFA) were analyzed according to Adams et al. (1984) using a Dionex Ultimate[®] 3000
809 HPLC system (Waltham, MA, USA) equipped with an Acclaim Rezex Organic Acid H +
810 (8%) and a 7.8 x 300 mm column set at 210 nm and using 3 mM H₂SO₄ as eluent. Total
811 SCFA and SBFA were calculated as concentrations of acetate + propionate + butyrate and
812 isobutyrate + isovalerate + valerate, respectively. The DM content in the digesta from caecum
813 and colon was determined, and the concentration of organic acids was expressed as mmol/L
814 of the liquid phase of the digesta.

815

816 2.4. Chemical analysis

817 The fecal samples from each piglet were thawed, dried at 60°C to constant weight, and
818 combined proportionally according to the amounts collected within five days of measurement
819 to make an individual composite sample, which was subsequently analyzed. The daily urine
820 samples were thawed and proportionally combined to make a sample composed of each
821 animal for subsequent analysis. The ileum digesta samples were dried in a lyophilizer
822 (Omnitronics, SP Scientific, Warminster, PA) for 48 h and were combined to obtain 3
823 repetitions per treatment for analysis. Dry food samples (sorghum and complete diets) and
824 feces were ground to a size of 1 mm and analyzed according to the Association of Official
825 Analytical Chemists (AOAC, 1997) for DM by drying at 105°C to constant weight, ash by
826 combustion at 600°C for 2 h, , and ether extract (methods 934.01, 967.05, and 920.39,

827 respectively). Crude protein was analysed in foods, fecal and urine samples by the Kjeldahl
828 method (method 954.01). The analysis of the neutral detergent fiber (aNDF) was conducted
829 according to Mertens et al. (2002), using thermostable alpha-amylase and expressed including
830 residual ash, and the acid detergent fiber (ADF) was analyzed according to Method 973.18 of
831 the AOAC (AOAC, 1997). The starch and amylose contents were determined by enzymatic
832 hydrolysis using commercial kits (K-TSTA 07/11 and K-MYL, respectively, Megazyme
833 International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Sorghum grains were also characterized as
834 rapidly digestible starch (RDS, g/kg DM), slowly digestible starch (SDS, g/kg DM), and
835 resistant starch (RS, g/kg DM) according to Englyst et al. (1992).

836

837 2.6. Calculations and statistical analysis

838 The apparent digestibility coefficient of the total digestive tract was calculated as:

$$839 \frac{[\text{ingested nutrient (g / d)} - \text{nutrient excreted in feces (g / d)}]}{\text{ingested nutrient (g / d)}} \quad (1)$$

840 The retention of N was calculated as:

$$841 \text{N ingested (g / d)} - [\text{N excreted in urine (g / d)} + \text{N excreted in faeces (g / d)}]. \quad (2)$$

842 The ileal digestibility of starch was determined according to van Leeuwen et al. (1996):

$$843 1 - \frac{[\text{N digest (g / kg)} / \text{M digest (g / kg)}]}{[\text{M food (g / kg)} / \text{N food (g / kg)}]}, \quad (3)$$

844 where N digesta (g / kg) is the content of the nutrient in the digesta, M digesta (g / kg) is the
845 content of the marker in the digesta, M food (g / kg) is the content of the marker in the food
846 and N food (g / kg) is the content of the nutrient in the food.

847

848 The data were analyzed to confirm that the assumptions of the analysis of variance were met
849 using the PROC UNIVARIATE procedure (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC). The
850 data of feed intake, apparent digestibility of the total tract, N balance, fecal characteristics
851 were analyzed using the SAS MIXED procedure, according to the model:

852 $Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + e_{ij},$ (4)

853 where μ is the average of the parameter, T_i is the fixed effect of the type of grain processing (i
854 = dry, reconstituted or ensiled), P_j is the random effect of the plot ($j = 9$ plots, 3 for each type
855 of processing of grain) and e_{ij} is the residual error. Comparisons between means were made
856 using previously planned orthogonal contrasts, to study the effects of the type of grain
857 processing (C1 = dry grains vs. fermented grains), and the processing methods between them
858 (C2 = reconstituted grains vs. early harvested ensiled grains).

859 The data of DM content and organic acids in the cecum and colon digesta were compared
860 between treatments according to the model:

861 $Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + D_k + (T \times D)_{ik} + e_{ijk}$ (5)

862 where μ is the average of the parameter, T_i is the fixed effect of the diet formulated with
863 sorghum grains subjected to different types of processing ($i =$ dry, reconstituted or ensiled), P_j
864 is the random effect of the plot ($j = 9$ plots, 3 for each type of grain processing), D_k is the
865 fixed effect of the type of digest analyzed ($k =$ cecum or colon) and e_{ijk} is the residual error.
866 For these parameters, comparisons between means were made using the Tukey test. For all
867 data, statistical significance was considered at $P < 0.05$ and trends at $P < 0.10$.

868

869 **3. Results**

870 3.1. Feed intake, digestibility of nutrients and nitrogen balance.

871 Piglets fed the diet containing reconstituted grains (REC) tended to consume fewer grams of
872 DM per day than piglets that received the diet formulated with ensiled grains ($P = 0.070$,
873 Table 2). But, when analyzing the intakes relative to live weight, the animals fed with diets
874 containing dry grains (DRY) consumed a greater quantity than those that received diets with
875 fermented grains ($P = 0.003$), and between these two groups, what they received ENS
876 consumed more than those fed REC ($P = 0.021$). On the other hand, the apparent digestibility

877 of CP tended to be lower in the ENS diet than in the REC diet ($P = 0.051$), and the DRY diet
878 presented a higher digestibility of NDF, FAD and hemicelluloses than the diets containing
879 fermented grains. ($P < 0.05$). The apparent digestibility of starch measured in the ileum was
880 similar between the three diets.

881

882 Regarding the parameters of N consumption and excretion (Table 3), although N
883 consumptions were similar between treatments for the period of measurement considered (5
884 days), fecal N excretion was higher ($P = 0.035$) and the relationship between N eliminated in
885 feces and N consumed tended to be higher ($P = 0.053$) in piglets that received the ENS diet
886 compared to those that received REC. Furthermore, the relationship between N eliminated in
887 urine and N consumed tended to be lower in piglets fed diets containing dry grains ($P =$
888 0.054). However, N retained and the relationship between N retained and consumed were
889 similar between treatments.

890

891 3.2. Faecal and digestive parameters, and production of organic acids in the hindgut.

892 Piglets fed the ENS diet excreted a greater amount of feces per day ($P = 0.050$) and the daily
893 fecal excretion expressed as g of DM tended to be higher ($P = 0.056$) in this group than in the
894 piglets that received the diet containing reconstituted grains (Table 4). The fecal consistency
895 was similar between treatments, as were the pH values recorded in the ileum, cecum, middle
896 colon and feces digests. When comparing the different points where we measured the pH, it
897 was observed that the pH values registered in the cecum and colon were similar to each other
898 ($P = 0.635$) regardless of the diet (P of interaction treatment \times measurement site = 0.660), but
899 they were lower than those registered in ileum and feces ($P < 0.0001$). In addition, the pH
900 values recorded in the ileum were higher than those recorded in the stool (mean pH in ileum =
901 6.60 vs. mean pH in stool = 6.18 ; $P < 0.0001$).

902

903 The DM contents of caecum and colon digesta, and the final fermentation products in the
904 large intestine of the piglets are presented in Table 5. The DM content of the digesta in the
905 caecum and in the colon differed between treatments, and was higher in the digesta of piglets
906 fed the SEC diet ($P = 0.008$). Furthermore, the digesta of piglets fed ENS tended to have the
907 lowest concentration of propionate ($P = 0.087$). The digesta of those who received REC
908 tended to present a lower concentration of butyrate ($P = 0.055$), presented lower
909 concentrations of isovalerate ($P = 0.016$), lower contents of BCFA ($P < 0.001$) and lower
910 molar proportions of butyrate ($P = 0.041$) than those who received the other diets.

911

912 **4. Discussion**

913

914 This experiment was aimed to compare the digestive utilization of the starch of sorghum
915 grains subjected to different post-harvest treatments when they are used in the formulation of
916 complete diets for piglets. The treatments were based on the fermentation (by reconstituting
917 dry grains or by ensiling immature high-moisture grains) of sorghum grains harvested from
918 the same crop. At the farm level, these treatments can be useful to preserve the grains and at
919 the same time to attempt to increase their nutritional value. Our original hypothesis was that
920 the starch from silage immature grains would be more digestible than that of mature dry
921 grains and, furthermore, that reconstitution of dry grains would have effects similar to silage
922 from wet grains. For this purpose, we reconstituted the dry harvested grains to the same
923 moisture level as those harvested at an early stage. When comparing the moisture contents in
924 the reconstituted grains and in the silage, we observed that this parameter was similar in both
925 treatments (403 vs. 418 g / kg, respectively; P value of the contrast = 0.335; data not shown).

926 Additionally, the pH values measured in these grains were equal to or less than 4, which
927 would indicate a good fermentation process and efficient preservation of the grains.

928

929 When analyzing the chemical composition of sorghum grains (data not shown), we observed
930 that kafirin concentrations were higher in ensiled grains than in the dry and in the
931 reconstituted grains (45.2, 33.5 and 32.9 g/kg DM, respectively; $P = 0.037$). The levels of
932 condensed tannins were low in all grains, although the dry ones had lower contents than the
933 reconstituted grains and the ensiled ones (0.12, 0.20 and 0.35 g/kg DM, respectively; $P =$
934 0.049). The starch content was higher in the dry grains than in the reconstituted and in the
935 ensiled ones (614, 586 and 553 g/kg of DM, respectively; $P < 0.01$). The amylose content in
936 the dry grains was similar to that of ensiled grains (24.0 and 24.5 g/100 g starch,
937 respectively), while the reconstituted grains had the lowest level of amylose (20.1 g/100 g
938 starch; $P < 0.01$). The dry grains had higher levels of rapidly digestible starch (129 g/kg DM)
939 and resistant starch (289 g/kg DM) and lower levels of slowly digestible starch (195 g/kg
940 DM) than reconstituted grains and ensiled grains (RDS: 56.2 and 30.5 g/kg DM; RS: 181 and
941 172 g/kg DM; RDS: 348 and 351 g/kg DM, respectively; $P < 0.001$) This led to differences in
942 the starch fractions of the experimental diets, although no statistical differences were observed
943 in the total starch contents of the three diets.

944

945 The results observed on the relative feed intake indicate a possible effect of the moisture
946 content of the diets, since feed intake in the diets containing fermented grains was lower than
947 the DRY treatment. Similarly, Bauzá et al. (2018) reported lower feed intake in pigs fed diets
948 containing high-moisture sorghum grain silage low in tannins with respect to dry diets, an
949 effect that they attributed to differences in the moisture content of the diets. On the other
950 hand, some differences were observed in the digestibility of the nutrients. The apparent

951 digestibility of crude protein from the ENS diet tended to be lower than that of the REC diet,
952 possibly due to differences in the kafirin content of both diets, being 27.7 and 20.3 g/kg DM
953 for the ENS and REC diets respectively. Although these differences are subtle, kafirins are
954 hydrophobic proteins, with a poor amino acid profile, and their β and γ fractions located on
955 the periphery of the protein body form disulfide bonds, which reduces their digestibility (Liu
956 et al., 2015; Nyannor et al., 2007). Other factors that may negatively influence protein
957 digestibility in sorghum-containing diets are the presence of tannins (Liu et al., 2015;
958 Mariscal-Landín et al., 2004) and other polyphenols (Khoddami et al., 2015), or the presence
959 of phytates (Selle et al., 2012; Zouaoui et al., 2018), factors that could also be involved in this
960 case. The differences in the digestibilities of the neutral and acid detergent fiber fractions and
961 of hemicelluloses were remarkably low in the diets containing reconstituted and ensiled
962 grains, and they seem to be related to some of the aforementioned factors, or to interactions
963 between the fiber fraction with other components of the diet (Urriola and Stein, 2010).
964 However, the apparent ileal digestibility of starch was high and identical in all the diets. This
965 indicates no effects of treatments, and that for this genotype of sorghum grain the treatments
966 that involve reconstitution or ensiling of the grain would not be justified as a way to increase
967 the digestive utilization of this nutrient.

968

969 Regarding the N balance parameters, we observed that the piglets fed the ENS diet excreted a
970 greater daily amount of N than those that received REC, and also the relationship between
971 urinary N and ingested N tended to be lower in the fed with DRY. However, when comparing
972 the total and relative retention of N, we observed that there were no differences between
973 treatments. N retention is related to the glycemic index of diets, since feeds with high
974 glycemic indices cause rapid increases in blood glucose and insulin, followed by a precipitous
975 decrease in blood glucose due to the action of insulin, which determines the onset of hunger

976 by stimulating the start of a new meal, and consequently weight gain (Bell and Sears, 2003;
977 Drew et al., 2012; Menoyo et al., 2011). In addition, the higher rates of starch digestion cause
978 increases in blood glucose, stimulate the release of insulin that acts on the body's cells,
979 stimulating the uptake of amino acids by muscle tissue, and inhibiting the breakdown of
980 muscle proteins (Drew et al. , 2012), which links N metabolism with signaling components
981 associated with insulin and the characteristics of starch. The diets used in this work had a
982 relatively high predicted glycemic index (pGI> 70; data not shown) when compared with
983 other starchy foods (G Giuberti et al., 2012; Ottoboni et al., 2019). In addition, the high
984 efficiency in N retention observed was probably linked to the synchronous presence of starch
985 and proteins, since a higher efficiency of lean tissue deposition in pigs is associated with a
986 higher activation of insulin-like signaling components (Suryawan et al., 2006), since possibly
987 the levels of kafirins and tannins in the grains were not high enough to cause marked
988 decreases in the digestibility of starch and amino acids. In this sense, Reis de Souza et al.
989 (2019) observed that the ileal digestibility of starch and amino acids in diets for pigs
990 containing sorghum grains was not affected by the level of kafirins in the grains (42.5 to 57.0
991 g/kg DM), but the amino acid digestibility was diminished by the effect of the tannin levels
992 contained in the grains (0.03 to 6.9% of tannins in the low and high grains, respectively).

993

994 The piglets fed the diet containing ensiled grains excreted 33% more fresh feces per day than
995 those that received the REC diet, and this trend was maintained when comparing the fecal
996 excretion expressed in grams of dry feces between both treatments (Table 4; P = 0.056),
997 probably due to the higher relative DM consumption in the piglets that received ENS.

998 Considering the concentration of the different nutrient fractions in the faeces, we only find
999 that the levels of NDF and ADF in the faeces of the piglets fed REC and ENS (34% and 25%,
1000 and 32% and 24% in DM basis, respectively) tended to be higher than those who received

1001 DRY (26% and 19% respectively; $P = 0.07$ and $P = 0.08$) which is associated with the
1002 differences observed in the digestibilities of the fibrous fractions between treatments.
1003 Possibly, the lower DM contents of the cecum and colon digests in the piglets that received
1004 the REC and ENS diets are related to these higher fiber contents, which can generate a higher
1005 viscosity and water retention capacity in the digesta in those treatments (Hooda et al., 2011;
1006 Lindberg, 2014). Despite the digestibilities of DM and OM were similar between diets, the
1007 ENS treatment was the one that presented the lowest numerical values, which could partly
1008 explain the higher fecal excretion observed. The pH values measured in the different
1009 segments of the intestine and feces did not differ between treatments, but they did differ
1010 within each treatment for each measurement site. The pH of the digesta and the feces depends
1011 on the concentration of organic acids they contain. The absorption of volatile fatty acids from
1012 the intestinal lumen is almost complete (Bergman, 1990), rapidly diffusing through the
1013 membranes of epithelial cells passively or by transporters (Bach Knudsen et al., 2016;
1014 Martinez-Puig et al., 2003), which is in agreement with the pH variations recorded at the
1015 different measurement points.

1016

1017 According to the production profile of organic acids measured in the cecum and colon, it
1018 seems to have been a certain component of fermentation based on resistant starch in the
1019 piglets that received the DRY and ENS treatments, given the observed production of butyrate
1020 (Giuberti et al., 2015), although the production of BCFA in the DRY and REC treatments
1021 indicates that there was also fermentation of amino acids (Macfarlane and Macfarlane, 2003).
1022 SCFAs have a trophic effect on the intestinal epithelium, maintaining the integrity of the
1023 mucosa against pathogens (Calabrò et al., 2012), butyrate being of special interest since it is a
1024 source of energy and stimulant of enterocyte mitosis (Claus et al., 2007; Giuberti et al.,
1025 2014a). In any case, the presence of RS with the inclusion of sorghum grains in diets for

1026 growing pigs could be interesting as a way to generate some fermentation products in the
1027 large intestine highly linked to intestinal health (Jha et al., 2019), as long as this does not
1028 become a limitation for the digestion of starch in the small intestine.

1029

1030 **5. Conclusion**

1031 The reconstitution and ensiling processes caused some modifications in the chemical
1032 composition of the sorghum grains, in terms of losses of some fractions of rapidly digestible
1033 starch, and lower levels of resistant starch. When the complete diets were evaluated, the
1034 effects observed in the grains were not evident, and the high digestibility of starch in the diets,
1035 considering the genotype of sorghum grain used in the study, indicates that the treatments
1036 conducted were not necessary to improve the digestive use of nutrients. In addition, there
1037 seems to be a high synchrony between starch digestion and proteins that resulted in high N
1038 retention. The production of organic acids reflected the profile of fermentable substrates,
1039 which was based on resistant starch and to a lesser extent on amino acids, which may be
1040 related to better intestinal health conditions.

1041

1042 **Acknowledgments**

1043 This work was supported by the ANII - FMV_1_2017_1_136157 project “Evaluation of diets
1044 containing high tannin sorghum grain on the digestion and meat quality in pigs”. The authors
1045 wish to thank the Zoots. Francisco Ribas and Luis Vallejos, and Tech. Juan Dayuto for their
1046 collaboration in the execution of the experimental protocol and during the sampling phase.

1047

1048 **References**

- 1049 Adams, R.F., Jones, R.L., Conway, P.L., 1984. High-performance liquid chromatography of
1050 microbial acid metabolites. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 336, 125–137.
1051 [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85136-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85136-1)
- 1052 Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination, ensiling
1053 and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 75–
1054 81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>
- 1055 Aguerre, M., Carriquiry, M., Astessiano, A.L., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Effect of
1056 sorghum grain supplementation on glucose metabolism in cattle and sheep fed temperate
1057 pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99, 465–473.
1058 <https://doi.org/10.1111/jpn.12220>
- 1059 Al-Rabadi, G.J., Torley, P.J., Williams, B. a., Bryden, W.L., Gidley, M.J., 2011. Effect of
1060 extrusion temperature and pre-extrusion particle size on starch digestion kinetics in barley
1061 and sorghum grain extrudates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168, 267–279.
1062 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.097>
- 1063 Arcari, M.A., Martins, C.M. de M.R., Tomazi, T., Santos, M.V. dos, 2016. Effect of the ensiling
1064 time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability.
1065 *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 60. [https://doi.org/10.11606/issn.1678-](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71)
1066 [4456.v53i1p60-71](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71)
- 1067 Audilakshmi, S., Stenhouse, J.W., Reddy, T.P., Prasad, M.V.R., 1999. Grain mould resistance
1068 and associated characters of sorghum genotypes. *Euphytica*.
1069 <https://doi.org/10.1023/A:1026410913896>
- 1070 Awika, J.M., Rooney, L.W., 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on
1071 human health. *Phytochemistry* 65, 1199–1221.
1072 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.001>
- 1073 Bach Knudsen, K.E., Lærke, H.N., Ingerslev, A.K., Hedemann, M.S., Nielsen, T.S., Theil, P.K.,

1074 2016. Carbohydrates in pig nutrition – recent advances. *J. Anim. Sci.* 94, 1–11.
1075 <https://doi.org/10.2527/jas2015-9785>

1076 Balderrama-Pérez, V.A., Gómez-Soto, J.G., Reis de Souza, T.C., Rodríguez, E.R., Mariscal-
1077 Landín, G., 2019. Is the kafirin profile capable of modulating the ileal digestibility of
1078 amino acids in a soybean meal-sorghum diet fed to pigs? *Anim. Nutr.*
1079 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.01.002>

1080 Barcellos, L.C.G., Furlan, A.C., Murakami, A.E., Silva, M.A.A. da, Silva, R.M. da, 2006.
1081 Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo
1082 de tanino para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 104–112.
1083 <https://doi.org/10.1590/s1516-35982006000100013>

1084 Bauer, E., Williams, B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2001. Microbial
1085 activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable
1086 carbohydrates. *Anim. Sci.* 73, 313–322. <https://doi.org/10.1017/S135772980005829X>

1087 Bauzá, R., Barreto, R., Bratschi, C., Silva, D., Tejero, B., 2016. Digestibilidad fecal aparente
1088 de partidas de sorgo con diferentes contenidos de taninos , sometidos a distintas
1089 tecnologías de procesamiento en cerdos Fecal Apparent Digestibility of Sorghum ' s
1090 Batches with Different Tannin Contents and Subjected to Vario. *Agrociencia Uruguay* 20,
1091 79–89.

1092 Bauzá, R., Brambillasca, S., Fernández-García, M., Barreto, R., Silva, D., Bratschi, C.,
1093 Cajarville, C., Repetto, J.L., Tejero, B., Bollazzi, I., Cardozo, A., Rosas, F., 2018. Estudio
1094 de alimentos alternativos al maíz y la harina de soja en dietas para cerdos en engorde. Serie
1095 FPTA N° 64. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo.

1096 Bean, S.R., Zhu, L., Smith, B.M., Wilson, J.D., Ioerger, B.P., Tilley, M., 2019. Starch and
1097 Protein Chemistry and Functional Properties, in: *Sorghum and Millets*. Elsevier, pp. 131–
1098 170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00006-X>

- 1099 Bell, S.J., Sears, B., 2003. Low-Glycemic-Load Diets: Impact on Obesity and Chronic
1100 Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 357–377.
1101 <https://doi.org/10.1080/10408690390826554>
- 1102 Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract
1103 in various species. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
- 1104 Beta, T., Rooney, L.W., Marovatsanga, L.T., Taylor, J.R.N., 2000. Effect of chemical
1105 treatments on polyphenols and malt quality in sorghum. *J. Cereal Sci.*
1106 <https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0310>
- 1107 Bhattarai, R.R., Dhital, S., Mense, A., Gidley, M.J., Shi, Y.C., 2018. Intact cellular structure in
1108 cereal endosperm limits starch digestion in vitro. *Food Hydrocoll.* 81, 139–148.
1109 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.027>
- 1110 Bird, A.R., Vuaran, M., Brown, I., Topping, D.L., 2007. Two high-amylose maize starches with
1111 different amounts of resistant starch vary in their effects on fermentation, tissue and digesta
1112 mass accretion, and bacterial populations in the large bowel of pigs. *Br. J. Nutr.* 97, 134–
1113 144. <https://doi.org/10.1017/S0007114507250433>
- 1114 Blakely, M.E., Rooney, L.W., Sullins, R.D., Miller, F.R., 1979. Microscopy of the Pericarp
1115 and the Testa of Different Genotypes of Sorghum 1 . *Crop Sci.* 19, 837–842.
1116 <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183x001900060023x>
- 1117 Boren, B., Waniska, R.D., 1992. Sorghum seed color as an indicator of tannin content. *J. Appl.*
1118 *Poult. Res.* <https://doi.org/10.1093/japr/1.1.117>
- 1119 Brambillasca, S., Fernández–García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019a.
1120 Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry
1121 sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.*
1122 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>
- 1123 Brambillasca, S., Fernández–García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019b.

1124 Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry
1125 sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.*
1126 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

1127 Brambillasca, S., Zunino, P., Cajarville, C., 2015. Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in
1128 diets for piglets: Influence on nutritional and faecal parameters, intestinal organs, and
1129 colonic fermentation and bacterial populations. *Livest. Sci.* 178, 243–250.
1130 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.003>

1131 Calabrò, S., Carciofi, A.C., Musco, N., Tudisco, R., Gomes, M.O.S., Cutrignelli, M.I., 2012.
1132 Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in
1133 vitro gas production technique. *Ital. J. Anim. Sci.* 12, 21–27.
1134 <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e4>

1135 Cervantes-Pahm, S.K., Liu, Y., Stein, H.H., 2014. Comparative digestibility of energy and
1136 nutrients and fermentability of dietary fiber in eight cereal grains fed to pigs. *J. Sci. Food*
1137 *Agric.* 94, 841–849. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6316>

1138 Chen, H.M., Lifschitz, C.H., 1989. Preparation of fecal samples for assay of volatile fatty acids
1139 by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.*
1140 35, 74–6.

1141 Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health:
1142 A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>

1143 Claus, R., Günthner, D., Letzguß, H., 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal
1144 morphology and function in the small intestine of the pig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*
1145 (Berl). 91, 312–318. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00655.x>

1146 Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H., De Lange, L., 2005. Estimation of protein
1147 fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. *Anim. Feed*
1148 *Sci. Technol.* 123–124 Pa, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.020>

- 1149 Darragh, A.J., Hodgkinson, S.M., 2000. Quantifying the digestibility of dietary protein, in:
1150 Journal of Nutrition. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1850s>
- 1151 De Blas, C., Gasa, J., Mateos, G.G., López-Bote, C., Gorrachategui, M., Aguilera, J., Fructuoso,
1152 G., 2013. NECESIDADES NUTRICIONALES PARA GANADO PORCINO NORMAS
1153 FEDNA (2^a edición). FEDNA.
- 1154 de Lange, C.F.M., Zhu, C.H., 2012. Liquid feeding corn-based diets to growing pigs: Practical
1155 considerations and use of co-products, in: Feed Efficiency in Swine. pp. 63–80.
1156 https://doi.org/10.3920/978-90-8686-756-1_3
- 1157 De Schrijver, R., Vanhoof, K., Vande Ginste, J., 1999. Effect of enzyme resistant starch on
1158 large bowel fermentation in rats and pigs. Nutr. Res. [https://doi.org/10.1016/S0271-](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00053-6)
1159 [5317\(99\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00053-6)
- 1160 del Palacio, A., Mionetto, A., Bettucci, L., Pan, D., 2016. Evolution of fungal population and
1161 mycotoxins in sorghum silage. Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo.
1162 Risk Assess. 33, 1864–1872. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1244732>
- 1163 Dlamini, N.R., Taylor, J.R.N., Rooney, L.W., 2007. The effect of sorghum type and processing
1164 on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. Food Chem.
1165 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.017>
- 1166 Doherty, C., Faubion, J., Rooney, W., 1982. Semiautomated determination of phytate in
1167 sorghum and sorghum products. Cereal Chem.
- 1168 Drew, M.D., Schafer, T.C., Zijlstra, R.T., 2012. Glycemic index of starch affects nitrogen
1169 retention in grower pigs. J. Anim. Sci. 90, 1233–1241. [https://doi.org/10.2527/jas.2010-](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3458)
1170 [3458](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3458)
- 1171 Dykes, L., Rooney, L.W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. J. Cereal Sci.
1172 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>
- 1173 Earp, C.F., McDonough, C.M., Awika, J., Rooney, L.W., 2004. Testa development in the

1174 caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Cereal Sci.*
1175 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.11.005>

1176 El Khalifa, A.O., El Tinay, A.H., 1994. Effect of fermentation on protein fractions and tannin
1177 content of low- and high-tannin cultivars of sorghum. *Food Chem.* 49, 265–269.
1178 [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90171-6)

1179 Elkhailil, E.A.I., Tinay, A.H. El, Mohamed, B.E., Elsheikh, E.A.E., 2001. Effect of malt
1180 pretreatment on phytic acid and in vitro protein.pdf 72, 30–33.

1181 Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H., 1992. Classification and measurement of
1182 nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* [https://doi.org/10.1111/j.1750-](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x)
1183 [3841.2010.01627.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x)

1184 FENTON, T.W., FENTON, M., 1979. AN IMPROVED PROCEDURE FOR THE
1185 DETERMINATION OF CHROMIC OXIDE IN FEED AND FECES. *Can. J. Anim. Sci.*
1186 59, 631–634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>

1187 Freitas, L.S. De, Lopes, D.C., Freitas, A.F. De, Costa, J., Corassa, A., Pena, S.D.M., Costa,
1188 L.F., 2006. *Revista Brasileira de Zootecnia* Effects of feeding organic acids for piglets
1189 from 21 to 49 days old.

1190 García y Santos, C., Bettucci, L., Brambillasca, S., Cajarville, C., 2020. Storage time and
1191 condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro
1192 fermentation and mold populations. *Anim. Nutr.* 6, 92–97.
1193 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.08.002>

1194 Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Masoero, F., 2012. In vitro starch digestion and predicted
1195 glycemic index of cereal grains commonly utilized in pig nutrition. *Anim. Feed Sci.*
1196 *Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.006>

1197 Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., 2012. Plasma glucose response and glycemic indices in
1198 pigs fed diets differing in in vitro hydrolysis indices. *animal* 6, 1068–1076.

- 1199 <https://doi.org/10.1017/S1751731111002345>
- 1200 Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., Ferraretto, L.F., Hoffman, P.C., Shaver, R.D., 2014a.
- 1201 Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review.
- 1202 Starch/Staerke. <https://doi.org/10.1002/star.201300177>
- 1203 Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., Ferraretto, L.F., Hoffman, P.C., Shaver, R.D., 2014b.
- 1204 Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review.
- 1205 Starch/Staerke. <https://doi.org/10.1002/star.201300177>
- 1206 Giuberti, G., Gallo, A., Moschini, M., Masoero, F., 2015. New insight into the role of resistant
- 1207 starch in pig nutrition. Anim. Feed Sci. Technol.
- 1208 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.004>
- 1209 Gollcher, A.M.R., de Freitas Lima, J.A., Fialho, E.T., Rodrigues, P.B., de Lima, R.R., 2010.
- 1210 Nutritional value of high and low tannin high-moisture sorghum grain silage in horses.
- 1211 Rev. Bras. Zootec. 39, 1246–1251. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000600012>
- 1212 Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B. a., Debersaques, F.M. a., Lantinga, E. a., 1996.
- 1213 Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds.
- 1214 Anim. Feed Sci. Technol. 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)
- 1215 Hadebe, S.T., Modi, A.T., Mabhaudhi, T., 2017. Drought Tolerance and Water Use of Cereal
- 1216 Crops: A Focus on Sorghum as a Food Security Crop in Sub-Saharan Africa. J. Agron.
- 1217 Crop Sci. <https://doi.org/10.1111/jac.12191>
- 1218 Hamaker, B.R., Mohamed, A.A., Habben, J.E., Huang, C.P., Larkins, B.A., 1995. Efficient
- 1219 procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin
- 1220 contents than the conventional method. Cereal Chem. 72, 583–588.
- 1221 Hawton, J., Bache, D., McKenzie, B., 1980. High-moisture Grains for Swine. Pork Ind. Handb.
- 1222 1–6.
- 1223 Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G.A., Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994.

1224 Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.*
1225 <https://doi.org/10.2527/1994.7292227x>

1226 Healy, B.J., Hancock, J.D., Kennedy, G. a, Bramel-Cox, P.J., Behnke, K.C., Hines, R.H., 1994.
1227 Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs. *J. Anim. Sci.*
1228 72, 2227–36.

1229 Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt,
1230 R.J., Charley, R.C., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the
1231 starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, 2465–2474.
1232 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3562>

1233 Hongtrakul, K., Goodband, R.D., Behnke, K.C., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Bergström, W.B.,
1234 Nessmith Jr., W.B., Kim, I.H., 1998. The Effects of Extrusion Processing of Carbohydrate
1235 Sources on Weanling Pig Performance. *J. Anim. Sci.* 3034–3042.

1236 Hooda, S., Metzler-Zebeli, B.U., Vasanthan, T., Zijlstra, R.T., 2011. Effects of viscosity and
1237 fermentability of dietary fibre on nutrient digestibility and digesta characteristics in ileal-
1238 cannulated grower pigs. *Br. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1017/S0007114511000985>

1239 Humer, E., Schwarz, C., Schedle, K., 2015. Phytate in pig and poultry nutrition. *J. Anim.*
1240 *Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 99, 605–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>

1241 Huntington, G.B., 1997. Starch Utilization by Ruminants: From Basics to the Bunk. *J. Anim.*
1242 *Sci.* 75, 852–867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>

1243 Jha, R., Fouhse, J.M., Tiwari, U.P., Li, L., Willing, B.P., 2019. Dietary fiber and intestinal
1244 health of monogastric animals. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–12.
1245 <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00048>

1246 Kaufman, R.C., Wilson, J.D., Bean, S.R., Xu, F., Shi, Y.C., 2017. Sorghum starch properties
1247 as affected by growing season, hybrid, and kernel maturity, *Journal of Cereal Science.*
1248 <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.014>

1249 Khoddami, A., Truong, H.H., Liu, S.Y., Roberts, T.H., Selle, P.H., 2015. Concentrations of
1250 specific phenolic compounds in six red sorghums influence nutrient utilisation in broiler
1251 chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 210, 190–199.
1252 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.029>

1253 Kim, I.H., Cao, H., Hancock, J.D., Park, J.S., Li, D.F., 2000. Effects of Processing and Genetics
1254 on the Nutritional Value of Sorghum in Chicks and Pigs - Review -. *Asian-Australasian J.*
1255 *Anim. Sci.* <https://doi.org/10.5713/ajas.2000.1337>

1256 Kim, I.H., Hancock, J.D., Kim, J.H., Kennedy, G.A., Hines, R.H., Behnke, K.C., Nichols, D.A.,
1257 2002. Processing procedures and feeding systems for sorghum-based diets given to
1258 lactating sows. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15, 1186–1190.
1259 <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1186>

1260 Kumar, V., Elangovan, A. V, Mandal, A.B., 2005. Utilization of reconstituted high-tannin
1261 sorghum in the diets of broiler chickens. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 18, 538–544.
1262 <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.538>

1263 Lindberg, J.E., 2014. Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*
1264 5, 15. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-15>

1265 Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D., Cowieson, A.J., 2008. Effect of diet containing phytate and phytase
1266 on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter
1267 in chickens. *J. Anim. Sci.* 86, 3432–3439. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1234>

1268 Liu, S., Fox, G., Khoddami, A., Neilson, K., Truong, H., Moss, A., Selle, P., 2015. Grain
1269 Sorghum: A Conundrum for Chicken-Meat Production. *Agriculture* 5, 1224–1251.
1270 <https://doi.org/10.3390/agriculture5041224>

1271 Liu, S.Y., Selle, P.H., Cowieson, A.J., 2013. Strategies to enhance the performance of pigs and
1272 poultry on sorghum-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*
1273 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.008>

- 1274 Lizardo, R., Peiniau, J., Aumaitre, A., 1995. Effect of sorghum on performance, digestibility of
1275 dietary components and activities of pancreatic and intestinal enzymes in the weaned
1276 piglet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 56, 67–82. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00813-](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00813-3)
1277 3
- 1278 Lopes, A.B.R. de C., Tse, M.L.P., Silva, A.M.R. da, Trindade Neto, M.A. da, Pereira, C.S.,
1279 Saleh, M.A.D., Berto, D.A., 2017a. High-moisture sorghum grain silage with low- and
1280 high-tannin contents for weanling piglets. *Ciência Rural* 47. [https://doi.org/10.1590/0103-](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255)
1281 8478cr20151255
- 1282 Lopes, A.B.R. de C., Tse, M.L.P., Silva, A.M.R. da, Trindade Neto, M.A. da, Pereira, C.S.,
1283 Saleh, M.A.D., Berto, D.A., 2017b. High-moisture sorghum grain silage with low- and
1284 high-tannin contents for weanling piglets. *Ciência Rural* 47. [https://doi.org/10.1590/0103-](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255)
1285 8478cr20151255
- 1286 Lopes, A.B.R.C., Tse, M.L.P., de Silva, A.M.R., Neto, M.A.T., Pereira, C.S., Saleh, M.A.D.,
1287 Berto, D.A., 2017. High-moisture sorghum grain silage with low-and high-tannin contents
1288 for weanling piglets. *Cienc. Rural*. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>
- 1289 Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc.*
1290 *Nutr. Soc.* 62, 67–72. <https://doi.org/10.1079/pns2002207>
- 1291 Mahgoub, S.E.O., Elhag, S.A., 1998. Effect of milling, soaking, malting, heat treatment and
1292 fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. *Food Chem.*
1293 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00109-X)
- 1294 Manzano, S., Williamson, G., 2010. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple
1295 decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food*
1296 *Res.* 54, 1773–1780. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000019>
- 1297 Marfo, E.K., Simpson, B.K., Johnson, J.S.I., Oke, O.L., 1990. Effect of Local Food Processing.
1298 *J. Agric. Food Chem* 1580–1585.

1299 Mariscal-Landín, G., Avellaneda, J.H., Reis De Souza, T.C., Aguilera, A., Borbolla, G.A., Mar,
1300 B., 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin
1301 (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim. Feed Sci.*
1302 *Technol.* 117, 245–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.001>

1303 Martens, B.M.J., Gerrits, W.J.J., Bruininx, E.M.A.M., Schols, H.A., 2018. Amylopectin
1304 structure and crystallinity explains variation in digestion kinetics of starches across botanic
1305 sources in an in vitro pig model. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9, 91.
1306 <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0303-8>

1307 Martinez-Puig, D., Pérez, J.F., Castillo, M., Andaluz, A., Anguita, M., Morales, J., Gasa, J.,
1308 2003. Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of
1309 purine bases in growing pigs. *J. Nutr.* 133, 134–9.

1310 McCuistion, K.C., Selle, P.H., Liu, S.Y., Goodband, R.D., 2018. Sorghum as a feed grain for
1311 animal production, *Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional*
1312 *Attributes*. AACCI. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00012-5>

1313 Menoyo, D., Serrano, M.P., Barrios, V., Valencia, D.G., Lázaro, R., Argente, J., Mateos, G.G.,
1314 2011. Cereal type and heat processing of the cereal affect nutrient digestibility and
1315 dynamics of serum insulin and ghrelin in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 89, 2793–2800.
1316 <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3475>

1317 Merry, R.J., Davies, D.R., 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of
1318 aerobic spoilage in silage. *Lait*. <https://doi.org/10.1051/lait:1999112>

1319 Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K.,
1320 Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D.,
1321 Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex,
1322 N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral
1323 detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J.*

- 1324 AOAC Int. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>
- 1325 Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984a. Nutritive Value Of Reconstituted Sorghum
1326 Grains For Weanling Pigs. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas1984.5851211x>
- 1327 Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984b. The binding of dietary proteins by sorghum
1328 tannins in the digestive tract of pigs. *J. Nutr.* <https://doi.org/10.1093/jn/114.10.1787>
- 1329 Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1983. Improvement of the nutritive value of high tannin
1330 sorghums for broiler chickens by high moisture storage (reconstitution). *Poult. Sci.*
1331 <https://doi.org/10.3382/ps.0622065>
- 1332 Mundia, C.W., Secchi, S., Akamani, K., Wang, G., 2019. A Regional Comparison of Factors
1333 Affecting Global Sorghum Production: The Case of North America, Asia and Africa's
1334 Sahel. *Sustainability.* <https://doi.org/10.3390/su11072135>
- 1335 Noblet, J., Perez, J.M., 1993. Prediction of digestibility of nutrients and energy values of pig
1336 diets from chemical analysis. *J. Anim. Sci.* 71, 3389–3398.
1337 <https://doi.org/10.2527/1993.71123389x>
- 1338 Nyannor, E.K.D., Adedokun, S.A., Hamaker, B.R., Ejeta, G., Adeola, O., 2007. Nutritional
1339 evaluation of high-digestible sorghum for pigs and broiler chicks. *J. Anim. Sci.* 85, 196–
1340 203. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-116>
- 1341 Ottoboni, M., Tretola, M., Luciano, A., Giuberti, G., Gallo, A., Pinotti, L., 2019. Carbohydrate
1342 digestion and predicted glycemic index of bakery/confectionary ex-food intended for pig
1343 nutrition. *Ital. J. Anim. Sci.* 18, 838–849.
1344 <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1596758>
- 1345 Owsley, W.F., Knabe, D.A., Tanksley, T.D., 1981. Effect of sorghum particle size on
1346 digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-
1347 finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 52.
1348 <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas1981.523557x523557x>

- 1349 Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F., 2003.
1350 Microbiology of ensiling. *Silage Sci. Technol.* 31–93.
- 1351 Pan, L., Li, P., Ma, X.K., Xu, Y.T., Tian, Q.Y., Liu, L., Li, D.F., Piao, X.S., 2016. Tannin is a
1352 key factor in the determination and prediction of energy content in sorghum grains fed to
1353 growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 2879–2889. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0457>
- 1354 Pan, L., Ma, X., Hu, J., Liu, L., Yuan, M., Liu, L., Li, D., Piao, X., 2019. Low-tannin white
1355 sorghum contains more digestible and metabolisable energy than high-tannin red sorghum
1356 if fed to growing pigs. *Anim. Prod. Sci.* 59, 524. <https://doi.org/10.1071/AN17245>
- 1357 Patricio, V.M.I., Furlan, A.C., Moreira, I., Martins, E.N., Jobim, C.C., Costa, C., 2006.
1358 Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo
1359 de taninos para leitões na fase de creche. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1406–1415.
1360 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500021>
- 1361 Paulk, C.B., Hancock, J.D., Fahrenholz, A.C., Wilson, J.M., Mckinny, L.J., Behnke, K.C.,
1362 2015. Effects of sorghum particle size on milling characteristics and growth performance
1363 in finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*
1364 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.017>
- 1365 Poelaert, C., Nollevaux, G., Boudry, C., Taminiau, B., Nezer, C., Daube, G., Schneider, Y.J.,
1366 Portetelle, D., Théwis, A., Bindelle, J., 2017. Reducing agent can be omitted in the
1367 incubation medium of the batch in vitro fermentation model of the pig intestines. *Animal*
1368 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002749>
- 1369 Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage, 2003. 49, 6221.
- 1370 Regmi, P.R., Matte, J., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2010. Starch chemistry affects
1371 kinetics of glucose absorption and insulin response in swine. *Livest. Sci.* 134, 44–46.
1372 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.092>
- 1373 Regmi, P.R., Metzler-Zebeli, B.U., Ganzle, M.G., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra, R.T., 2011.

1374 Starch with High Amylose Content and Low In Vitro Digestibility Increases Intestinal
1375 Nutrient Flow and Microbial Fermentation and Selectively Promotes Bifidobacteria in
1376 Pigs. *J. Nutr.* 141, 1273–1280. <https://doi.org/10.3945/jn.111.140509>

1377 Reis de Souza, T.C., Ávila Árrés, I.E., Ramírez Rodríguez, E., Mariscal-Landín, G., 2019.
1378 Effects of kafirins and tannins concentrations in sorghum on the ileal digestibility of amino
1379 acids and starch, and on the glucose and plasma urea nitrogen levels in growing pigs.
1380 *Livest. Sci.* 227, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.06.022>

1381 Rooney, L.W., Pflugfelder, R.L., 1986. Factors Affecting Starch Digestibility with Special
1382 Emphasis on Sorghum and Corn1. *J. Anim. Sci.* 63, 1607–1623.
1383 <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351607x>

1384 Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., de Oliveira, R.F., Lopes, D.C.,
1385 Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R., 2017. Tabelas brasileiras para suínos e aves,
1386 Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.

1387 Sang, Y., Bean, S., Seib, P.A., Pedersen, J., Shi, Y.C., 2008. Structure and functional properties
1388 of sorghum starches differing in amylose content. *J. Agric. Food Chem.*
1389 <https://doi.org/10.1021/jf800577x>

1390 Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions
1391 in pig and poultry nutrition: A reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25, 1–17.
1392 <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>

1393 Selle, P.H., Liu, S.Y., Cowieson, A.J., 2013. Sorghum: An enigmatic grain for chicken-meat
1394 production, in: *Sorghum: Production, Growth Habits and Health Benefits*.

1395 Selle, P.H., Liu, S.Y., Khoddami, A., Cai, J., Cowieson, A.J., 2014. Steam-pelleting
1396 temperatures and grain variety of finely ground, sorghum-based broiler diets. 1. Influence
1397 on growth performance, relative gizzard weights, nutrient utilisation, starch and nitrogen
1398 digestibility. *Anim. Prod. Sci.* 54, 339. <https://doi.org/10.1071/AN13080>

1399 Serna-Saldivar, S.O., Espinosa-Ramírez, J., 2019. Grain Structure and Grain Chemical
1400 Composition, in: Sorghum and Millets. Elsevier, pp. 85–129.
1401 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00005-8>

1402 Shelton, J.L., Matthews, J.O., Southern, L.L., Higbie, A.D., Bidner, T.D., Fernandez, J.M.,
1403 Pontif, J.E., 2004. Effect of nonwaxy and waxy sorghum on growth, carcass traits, and
1404 glucose and insulin kinetics of growing-finishing barrows and gilts. *J. Anim. Sci.* 82,
1405 1699–1706. <https://doi.org/10.2527/2004.8261699x>

1406 Stevnebø, A., Sahlström, S., Svihus, B., 2006. Starch structure and degree of starch hydrolysis
1407 of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content.
1408 *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.015>

1409 Suarez-Belloch, J., Doti, S., Rodríguez-Romero, N., Guada, J.A., Fondevila, M., Latorre, M.A.,
1410 2013. Hindgut fermentation in pigs induced by diets with different sources or starch.
1411 *Spanish J. Agric. Res.* 11, 780–789. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013113-3958>

1412 Sullins, R.D., Rooney, L.W., 1975. Light and Scanning Electron Microscopic Studies of Waxy
1413 and Nonwaxy Endosperm Sorghum Varieties. *Cereal Chem.* 52, 361–366.

1414 Sun, T., Lærke, H.N., Jørgensen, H., Knudsen, K.E.B., 2006. The effect of extrusion cooking
1415 of different starch sources on the in vitro and in vivo digestibility in growing pigs. *Anim.*
1416 *Feed Sci. Technol.* 131, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.02.009>

1417 Suryawan, A., Escobar, J., Frank, J.W., Nguyen, H. V., Davis, T.A., 2006. Developmental
1418 regulation of the activation of signaling components leading to translation initiation in
1419 skeletal muscle of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 291.
1420 <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00069.2006>

1421 Taylor, J., Bean, S.R., Ioerger, B.P., Taylor, J.R.N., 2007. Preferential binding of sorghum
1422 tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and
1423 biodegradation. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.11.001>

- 1424 Taylor, J.R.N., 2018. Sorghum and millets: Taxonomy, history, distribution, and production,
1425 Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional Attributes. AACCI.
1426 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00001-0>
- 1427 Truong, H.H., Liu, S.Y., Selle, P.H., 2016a. Starch utilisation in chicken-meat production: The
1428 foremost influential factors. *Anim. Prod. Sci.* <https://doi.org/10.1071/AN15056>
- 1429 Truong, H.H., Neilson, K.A., McInerney, B. V., Khoddami, A., Roberts, T.H., Cadogan, D.J.,
1430 Liu, S.Y., Selle, P.H., 2017. Comparative performance of broiler chickens offered
1431 nutritionally equivalent diets based on six diverse, “tannin-free” sorghum varieties with
1432 quantified concentrations of phenolic compounds, kafirin, and phytate. *Anim. Prod. Sci.*
1433 57, 828–838. <https://doi.org/10.1071/AN16073>
- 1434 Truong, H.H., Neilson, K.A., McInerney, B. V., Khoddami, A., Roberts, T.H., Liu, S.Y., Selle,
1435 P.H., 2016b. Sodium metabisulphite enhances energy utilisation in broiler chickens
1436 offered sorghum-based diets with five different grain varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.*
1437 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.016>
- 1438 Urriola, P.E., Stein, H.H., 2010. Effects of distillers dried grains with solubles on amino acid,
1439 energy, and fiber digestibility and on hindgut fermentation of dietary fiber in a corn-
1440 soybean meal diet fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 88, 1454–1462.
1441 <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2162>
- 1442 van Kempen, T.A.T.G., Regmi, P.R., Matte, J.J., Zijlstra, R.T., 2010. In Vitro Starch Digestion
1443 Kinetics, Corrected for Estimated Gastric Emptying, Predict Portal Glucose Appearance
1444 in Pigs. *J. Nutr.* 140, 1227–1233. <https://doi.org/10.3945/jn.109.120584>
- 1445 van Leeuwen, P., Veldman, a, Boisen, S., Deuring, K., Van Kempen, G.J., Derksen, G.B.,
1446 Verstegen, M.W., Schaafsma, G., 1996. Apparent ileal dry matter and crude protein
1447 digestibility of rations fed to pigs and determined with the use of chromic oxide (Cr₂O₃)
1448 and acid-insoluble ash as digestive markers. *Br. J. Nutr.* 76, 551–562.

- 1449 <https://doi.org/10.1079/BJN19960062>
- 1450 Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., Haesaert, G., 2016. Occurrence,
1451 prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *J. Sci.*
1452 *Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.7565>
- 1453 Wang, T., Huang, Y., Yao, W., He, Q., Shao, Y., Li, H., Li, Y., Huang, F., 2019. Effect of
1454 conditioning temperature on pelleting characteristics, nutrient digestibility and gut
1455 microbiota of sorghum-based diets for growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 254,
1456 114227. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114227>
- 1457 Waniska, R.D., Poe, J.H., Bandyopadhyay, R., 1989. Effects of growth conditions on grain
1458 molding and phenols in sorghum caryopsis. *J. Cereal Sci.* <https://doi.org/10.1016/S0733->
1459 5210(89)80051-7
- 1460 Welsch, C.A., Lachance, P.A., Wasserman, B.P., 1989. Dietary Phenolic Compounds:
1461 Inhibition of Na⁺-Dependent D-Glucose Uptake in Rat Intestinal Brush Border Membrane
1462 Vesicles. *J. Nutr.* 119, 1698–1704. <https://doi.org/10.1093/jn/119.11.1698>
- 1463 Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., 2005. An in vitro
1464 batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric
1465 diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 Pa, 445–462.
1466 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.031>
- 1467 Wu, G., Ashton, J., Simic, A., Fang, Z., Johnson, S.K., 2018. Mineral availability is modified
1468 by tannin and phytate content in sorghum flaked breakfast cereals. *Food Res. Int.* 103,
1469 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.050>
- 1470 Ying, X., Gong, J., Goff, H.D., Yu, H., Wang, Q., Cui, S.W., 2013. Effects of pig colonic
1471 digesta and dietary fibres on in vitro microbial fermentation profiles. *Bioact.*
1472 *Carbohydrates Diet. Fibre.* <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.03.002>
- 1473 Zhou, X., Kaplan, M.L., 1997. Soluble Amylose Cornstarch Is More Digestible than Soluble

- 1474 Amylopectin Potato Starch in Rats. *J. Nutr.* 127, 1349–1356.
1475 <https://doi.org/10.1093/jn/127.7.1349>
- 1476 Zouaoui, M., Létourneau-Montminy, M.P., Guay, F., 2018. Effect of phytase on amino acid
1477 digestibility in pig: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 238, 18–28.
1478 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.019>
1479

1480 Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets.

	DRY	REC	ENS
<i>Ingredients (g/kg DM)</i>			
Dry grain	619	–	–
Reconstituted grain	–	619	–
Ensiled grain	–	–	619
Animal plasma	44	44	44
Extruded soybean	245	245	245
Soybean oil	36	36	36
Monocalcium phosphate	13	13	13
Calcium carbonate	10	10	10
Salt	17	17	17
Vitamin-mineral mix ^b	5	5	5
L-Lysine	4.5	4.5	4.5
DL-Methionine	2	2	2
L-Threonine	3.5	3.5	3.5
Mycotoxin adsorbent ^c	1	1	1
<i>Analysed nutrient composition (g/kg DM)</i>			
Dry mater	897 ± 2.8	709 ± 16.8	693 ± 24.8
Ash	68.9 ± 3.32	74.3 ± 8.14	83.3 ± 7.00
Organic matter	931 ± 3.3	926 ± 8.1	917 ± 7.0
Crude protein	224 ± 20.2	218 ± 10.6	220 ± 14.6
Neutral detergent fibre	93.8 ± 13.30	84.8 ± 19.45	96.7 ± 15.42
Acid detergent fibre	64.3 ± 8.59	62.8 ± 13.26	70.9 ± 11.33
Hemicelluloses	29.5 ± 6.10	22.0 ± 6.52	25.8 ± 9.57
Ether extract	75.8 ± 3.60	79.2 ± 8.38	80.3 ± 9.34
Starch	361 ± 14.8	370 ± 34.0	349 ± 20.4
Rapid digestible starch	53.3 ± 2.35	40.8 ± 2.09	53.2 ± 1.56
Slowly digestible starch	201 ± 2.73	249 ± 4.78	217 ± 4.69
Resistant starch	107 ± 2.13	79.6 ± 2.60	78.8 ± 2.64
Metabolizable energy, (kcal/kg) ^d	3711	3705	3596

1481 ^aData are presented as means ± standard deviation (n=3). ^bSupplied per kg of feed: Vit. A,
1482 34,000 IU; Vit. E, 204 IU; Vit D3, 6,800 IU; Vit. K, 15 mg; thiamin (Vit. B1), 4.7 mg;
1483 riboflavin (Vit. B2), 18.5 mg; piridoxin (Vit. B6), 9.9 mg; Vit. B12, 0.10mg; panthotenic acid,
1484 69.7 mg; choline, 980 mg; niacin, 146 mg; folic acid, 1.6 mg; biotin, 0.5 mg; Mn, 151 mg; Se,
1485 1.3 mg; Cu, 50 mg; Fe, 403 mg; Zn, 390 mg; I, 4.7 mg. ^cFree-Tox, Nutrex, Belgium.
1486 ^dCalculated according to Noblet and Pérez (1993).

1487 Table 2. Feed intake, apparent total tract digestibility of nutrients and apparent ileal
 1488 digestibility of starch in piglets fed the experimental diets.

	Treatment ^a			SEM ^b	Contrasts ^c (P-value)	
	DRY	REC	ENS		C1	C2
Intake, g DM/d	1128	913	1106	72.0	0.189	0.070
Intake, g DM/kg BW	73.1	57.4	67.0	2.74	0.003	0.021
<i>Apparent total tract digestibility^d</i>						
Dry matter	0.895	0.887	0.846	0.016	0.193	0.118
Organic matter	0.894	0.896	0.854	0.016	0.390	0.119
Crude protein	0.858	0.863	0.811	0.015	0.285	0.051
Neutral detergent fibre	0.720	0.552	0.471	0.036	0.003	0.147
Acid detergent fibre	0.701	0.538	0.467	0.043	0.010	0.265
Hemicelluloses	0.766	0.563	0.470	0.058	0.013	0.296
Ether extract	0.866	0.850	0.807	0.024	0.251	0.246
<i>Apparent ileal digestibility^e</i>						
Starch	0.940	0.941	0.957	0.007	0.362	0.179

1489 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum grain;
 1490 ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean; ^cContrast:
 1491 C1=DRY *vs.* diets including fermented grains (reconstituted + ensiled); C2=REC *vs.* ENS; ^dvalues are
 1492 means and pooled SEM of 9 animals per group; ^evalues are means of pooled samples of ileal digesta
 1493 content from 3 animals per group.

1494 Table 3. N intake, excretion and retention in piglets fed the experimental diets.
 1495

	Treatment ^a			SEM ^b	Contrasts ^c (P-value)	
	DRY	REC	ENS		C1	C2
N intake, g/d	34.17	28.72	34.28	3.195	0.362	0.110
Faecal N, g/d	4.86	3.66	6.35	0.780	0.872	0.035
Faecal N, g/N intake	0.14	0.13	0.18	0.016	0.433	0.053
Urine N, g/d	3.38	3.75	3.80	0.414	0.195	0.890
Urine N, g/N intake	0.10	0.13	0.11	0.009	0.054	0.166
N retention, g/d	25.94	21.31	24.14	2.460	0.194	0.317
N retention, g/N intake	0.76	0.74	0.70	0.018	0.112	0.180

1496 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum grain;
 1497 ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
 1498 (n=9/treatment); ^cContrast: C1=DRY vs. diets including fermented grains (reconstituted + ensiled);
 1499 C2=REC vs. ENS.

1500 Table 4. Faecal characteristics and digesta and faecal pH in piglets fed the experimental diets.
 1501

	Treatment ^a			SEM ^b	Contrasts ^c (P-value)	
	DRY	REC	ENS		C1	C2
Wet faecal output, g/d	579	566	756	77.0	0.268	0.050
Faecal output, g DM/d	172	153	204	20.5	0.738	0.056
Faecal DM, %	31.1	27.6	28.8	2.06	0.151	0.556
Consistency ^d	2.44	2.23	2.27	0.223	0.385	0.881
Ileon pH	6.06	6.52	6.44	0.281	0.154	0.795
Caecum pH	5.67	5.88	5.67	0.086	0.307	0.103
Colon pH	5.73	5.87	5.73	0.060	0.363	0.100
Faecal pH	6.07	6.30	6.26	0.095	0.117	0.812

1502 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum grain;
 1503 ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
 1504 (n=9/treatment); ^cContrast: C1=DRY vs. diets including fermented grains (reconstituted + ensiled);
 1505 C2=REC vs. ENS. ^dFaecal consistency: 1 (firm faeces) to 4 (watery faeces).

1506 Table 5. Lactate, short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA)
 1507 concentrations, and DM content of digesta sampled in the caecum and the mid-colon sites from piglets
 1508 fed the experimental diets^a.

	Treatment ^a						SEM	P ^c		
	Caecum			Colon				T	D	T×D
	DRY	REC	ENS	DRY	REC	ENS				
DN (%)	12.8	10.3	8.81	13.2	10.1	10.1	0.67	0.008	0.301	0.409
mmol/L water digesta										
Lactate	15.4	9.72	11.3	7.69	10.5	8.98	4.75	0.948	0.390	0.618
Acetate	213	236	245	209	242	216	14.9	0.284	0.431	0.451
Propionate	112	114	87.5	107	106	87.2	8.13	0.087	0.376	0.823
Butyrate	63.2	42.5	58.8	65.1	40.8	56.7	6.28	0.055	0.875	0.904
Isovalerate	26.4	39.6	13.5	35.8	42.0	19.2	8.29	0.016	0.378	0.907
Valerate	43.4	45.8	30.1	45.7	39.5	29.9	9.88	0.439	0.696	0.609
Total SCFA	388	393	391	381	388	360	21.1	0.744	0.381	0.746
BCFA	69.8	85.4	43.7	81.5	81.5	46.7	10.61	<0.001	0.652	0.728
<i>Proporciones molares (%)</i>										
Acetate	54.3	60.5	62.7	55.6	62.6	57.4	3.04	0.234	0.744	0.247
Propionate	29.0	28.8	22.5	27.9	26.9	26.0	2.17	0.274	0.916	0.231
Butyrate	16.6	10.7	14.8	16.5	10.5	16.6	1.55	0.041	0.581	0.604

1509 ^aDRY=diet formulated with dry sorghum grain; REC=diet formulated with reconstituted sorghum
 1510 grain; ENS=diet formulated with ensiled high moisture sorghum grain. ^bStandard error of the mean
 1511 (n=3/treatment). ^cSignificance levels of treatment (T), digesta (D) and interaction treatment per digesta
 1512 (T×D).