

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Lic. María Celeste Rosso

Trabajo de tesis para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

CALIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE BURLANDA HÚMEDA DE
MAÍZ CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE CONTROL DE HONGOS Y
BACTERIAS PARA SER DESTINADA A ALIMENTACIÓN ANIMAL

Año 2020

CALIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE BURLANDA HÚMEDA DE
MAÍZ CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE CONTROL DE HONGOS Y
BACTERIAS PARA SER DESTINADA A ALIMENTACIÓN ANIMAL

Directora de Tesis:

Dra. María Alejandra Perez Agostini

Tribunal Examinador de Trabajo Final:

Dra. Verónica Mary

Ing. Agr. Mg. Catalina Boetto

Dr. Martin Theumer

Lugar de trabajo:

Centro de Transferencia Calidad Agroalimentaria

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Alejandra Pérez Agostini por su constante dedicación, por brindarme abiertamente su conocimiento y experiencia.

Al grupo de trabajo de la cátedra de Biología celular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC, por su predisposición y colaboración en las tareas realizadas en el laboratorio.

A los docentes y directivos de la Maestría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos y a la Universidad Nacional de Córdoba por la formación académica.

A mis compañeros de maestría con quienes compartimos experiencias que fueron de gran valor en el transcurso del cursado y durante la elaboración de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. HIPÓTESIS | 7 |
| 3. OBJETIVOS:..... | 7 |
| Objetivo general..... | 7 |
| Objetivos específicos..... | 7 |
| CAPÍTULO 2 | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 2.1 Material | 13 |
| 2.2. Muestreo y tratamientos..... | 13 |
| 2.3. Calidad física de la burlanda húmeda de maíz..... | 14 |
| 2.4. Calidad química de la burlanda húmeda de maíz..... | 16 |
| 2.5. Diseño y Análisis estadístico | 17 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 18 |
| 3.1 Calidad Física | 18 |
| 3.2. Calidad química de la burlanda húmeda de maíz..... | 23 |
| 4. CONCLUSIONES | 26 |
| CAPÍTULO 3 | 27 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 27 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 2.1. Incidencia de hongos..... | 30 |
| 2.2. Recuento de microorganismos Mesófilos Aerobios totales | 31 |
| 2.3. Presencia de micotoxinas..... | 31 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 32 |
| 3.1. Incidencia de hongos..... | 32 |
| 3.2. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales..... | 37 |
| 3.3. Presencia de micotoxinas..... | 40 |
| 4. CONCLUSIONES | 42 |
| CAPÍTULO 4 | 43 |
| CONSIDERACIONES FINALES..... | 43 |
| REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 46 |

RESUMEN

La burlanda húmeda de maíz (WDGS), es un subproducto de la molienda seca de cereales de la producción industrial de bioetanol. Este subproducto es utilizado en la alimentación animal, ya que presenta una proporción elevada de proteína, grasa y fibra de gran importancia nutricional. Sin embargo, su almacenamiento en el campo presenta inconvenientes, ya que la burlanda debe acumularse y generalmente queda expuesta al oxígeno modificando su calidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad durante el almacenamiento de burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos de control de hongos y bacterias para ser destinada a alimentación animal. El estudio se llevó a cabo con WDGS de reciente elaboración en una planta próxima a la ciudad de Córdoba (Córdoba, Argentina). Los tratamientos aplicados fueron *Lactobacillus* y dos productos químicos comerciales: Virukill (N,N-Didecil-N,N-Cloruro de dimetilamonio), y Salpro (Ácido fórmico, Ácido propiónico y Formiato de amonio). Posteriormente se almacenaron en cámara a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 días. El muestreo se realizó a los 0, 7 y 14 días y las variables medidas fueron características físicas (color, pH y contenido de humedad) y químicas (contenido de proteínas, grasas y de materia seca). Desde el punto de vista sanitario se determinó incidencia fúngica, recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales y presencia de aflatoxinas totales y de zearalenona. De acuerdo a los resultados encontrados se sugiere que entre las características físicas el color y pH resultarían mediciones sencillas, en respuesta a posibles alteraciones de burlanda húmeda de maíz almacenada en condiciones de exposición al oxígeno. Durante el periodo evaluado, no se registraron modificaciones en cuanto a su composición nutricional en lo relativo a su contenido de proteínas, grasas y materia seca. Pero sí se observaron cambios en la contaminación con hongos micotoxicogénicos de riesgo potencial. La incidencia fúngica pudo ser controlada durante el almacenamiento al aplicar *Lactobacillus* y Salpro. Estos productos disminuyeron, además, la presencia de microorganismos mesófilos totales y

mantuvo baja la concentración de micotoxinas, asociado a un color amarillo claro brillante hasta el final del ensayo. La implementación del registro en burlanda almacenada en el campo, de variables de calidad (color, pH, screening de incidencia fúngica) no requiere de una gran inversión económica ni de proceso, y de esta manera se podrá fomentar el uso de WDGS a nivel regional como componente de la ración destinada a la alimentación animal y asegurar en cada eslabón de la cadena su calidad nutricional e inocuidad.

Palabras claves: Burlanda húmeda, alimentación animal, calidad sanitaria, inocuidad

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Esquema del proceso de producción de etanol a partir de la molienda seca de maíz | 4 |
| Figura 2.1 Escala de color Standard Reference Method (SRM) aplicada a la evaluación de burlanda húmeda. | 15 |
| Figura 2.2 Color de burlanda húmeda con diferentes tratamientos durante el almacenamiento | 18 |
| Figura 2.3 Contenido de proteína, grasa y materia seca de burlanda húmeda de maíz a los 0 y 14 días de almacenamiento | 24 |
| Figura 3.1 Condiciones de incubación en cámara para la determinación de incidencia fúngica | 30 |
| Figura 3.2 Presencia de hongos en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos | 33 |
| Figura 3.3 Diferentes hongos presentes en burlanda húmeda almacenada.. | 34 |
| Figura 3.4 Hongos, bacterias y levaduras mesófilos presentes en burlanda húmeda almacenada con distintos tratamientos. | 39 |
| Figura 4.1 Flujograma integrador de la determinación de variables de calidad en burlanda húmeda de maíz | 44 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 2.1 Tratamientos aplicados a burlanda húmeda de maíz | 14 |
| Tabla 2.2 Color en valores SRM de burlanda húmeda con diferentes tratamientos durante el almacenamiento | 19 |
| Tabla 2.3 pH de burlanda húmeda durante el periodo de almacenamiento con distintos tratamientos | 20 |
| Tabla 2.4 Densidad de burlanda húmeda (g/mL) durante el almacenamiento, con diferentes tratamientos..... | 21 |
| Tabla 2.5 Porcentaje de humedad de la burlanda húmeda durante el almacenamiento con distintos tratamientos. | 22 |
| Tabla 3.1 Presencia de hongos en burlanda húmeda de maíz con distintos tratamientos durante el almacenamiento | 36 |
| Tabla 3.2 Recuento de mesófilos aerobios totales (UFC/g) en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos | 38 |
| Tabla 3.3 Aflatoxinas y zearalenonas en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos..... | 40 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En el marco de la transformación de los sistemas de producción de alimentos argentinos, la interrelación vertical de las cadenas agroalimentarias alcanza un fuerte protagonismo. En la planificación de un sistema agroproductivo, los granos de cereales de alta calidad deberían ser destinados exclusivamente al consumo humano, mientras que aquellas partidas que no alcancen los estándares podrían ser direccionadas hacia otras alternativas de aprovechamiento tal como es su transformación en etanol, obteniendo como subproducto la burlanda destinada a la alimentación animal. En relación a ello es de destacar, el rápido crecimiento de la industria de bioetanol a nivel mundial como respuesta a la necesidad de energías alternativas, lo que ha incrementado la oferta de subproductos, entre ellos los granos de destilería (Zabed et al., 2017). Estos subproductos con solubles húmedos y secos se conocen por las siglas en inglés WDGS y DDGS o bien como burlanda húmeda y seca respectivamente.

El grano de maíz contiene un 70-75 % de carbohidratos, 8-10 % de proteína, 4-5 % de materia grasa y está compuesto por tres estructuras principales: el pericarpio, que es la capa exterior fibrosa que encierra al grano; el endosperma, que es la parte más importante y contiene el 98 % de los carbohidratos y 74 % de las proteínas; y el germen, compuesto por 83 % de aceite y 26 % de proteína (FAO, 1993). Durante su industrialización, los procesos de molienda húmeda y seca permiten separar los componentes en diferentes fracciones de carbohidratos, proteínas y aceite. Cada uno de ellos es aprovechado y muchas veces procesado, para obtener una gran cantidad de productos que se destinan al consumo directo o son empleados como insumos en otras industrias (Fernández Palma, 2014).

Dentro del modelo productivo de granos en Argentina, el maíz es uno de los cultivos de mayores posibilidades de agregado de valor, fundamentalmente por su

capacidad de transformación a proteína animal, dado que es el grano forrajero por excelencia (MAIZAR, 2012).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) reporta en sus informes que Argentina llegaría a producir 42,5 millones de toneladas en la campaña 2018/2019, lo que representa un incremento respecto a periodos anteriores en concordancia al crecimiento a nivel mundial de producción de maíz. Esta tendencia a ritmo creciente en la oferta de granos de maíz, se acompaña de una fuerte demanda de China y EEUU para ser empleados con fines industriales y piensos (FAO, 2018).

Además del aprovechamiento convencional del maíz para la producción de granos con fines forrajeros y alimenticios, este cultivo se incorpora cada vez más a la producción de energía renovable, mediante sistemas integrados de creación de valor agregado, con importantes aportes en la mitigación ambiental y en el desarrollo e integración económica y comercial de productores a nivel regional.

El bioetanol es el biocombustible que más se produce a nivel mundial (85 % del total); tiene un 66 % del valor energético del petróleo, pero debido a su mayor nivel de octanaje, la mezcla de ambos mejora su rendimiento y a la vez disminuye las emisiones de CO₂ y óxidos de azufre al ambiente (FAO, 2008; CADER, 2012).

El rápido crecimiento de esta industria a nivel mundial en respuesta a la necesidad de energías alternativas ha incrementado la oferta de subproductos (Kalscheur & Garcia, 2005; Zabed et al., 2017). En 2015 la producción de bioetanol alcanzó los 97.000 millones de litros, de los cuales 54.500 millones de litros (56,2 %) corresponderían a Estados Unidos y 27.800 millones de litros (28,6 %) a Brasil. El consumo de ambos países constituye el 83 % del consumo mundial, y es utilizado prácticamente como mezclas de gasolina en vehículos *flex fuel*. El resto de los países productores de etanol estarían por debajo de 2.000 millones de litros; entre los más importantes se destacan Canadá, Tailandia y Argentina (Maluenda García, 2016).

En nuestro país la Ley 26.093 del año 2006, estableció el régimen de promoción de biocombustibles a través de incentivos para la instalación de plantas

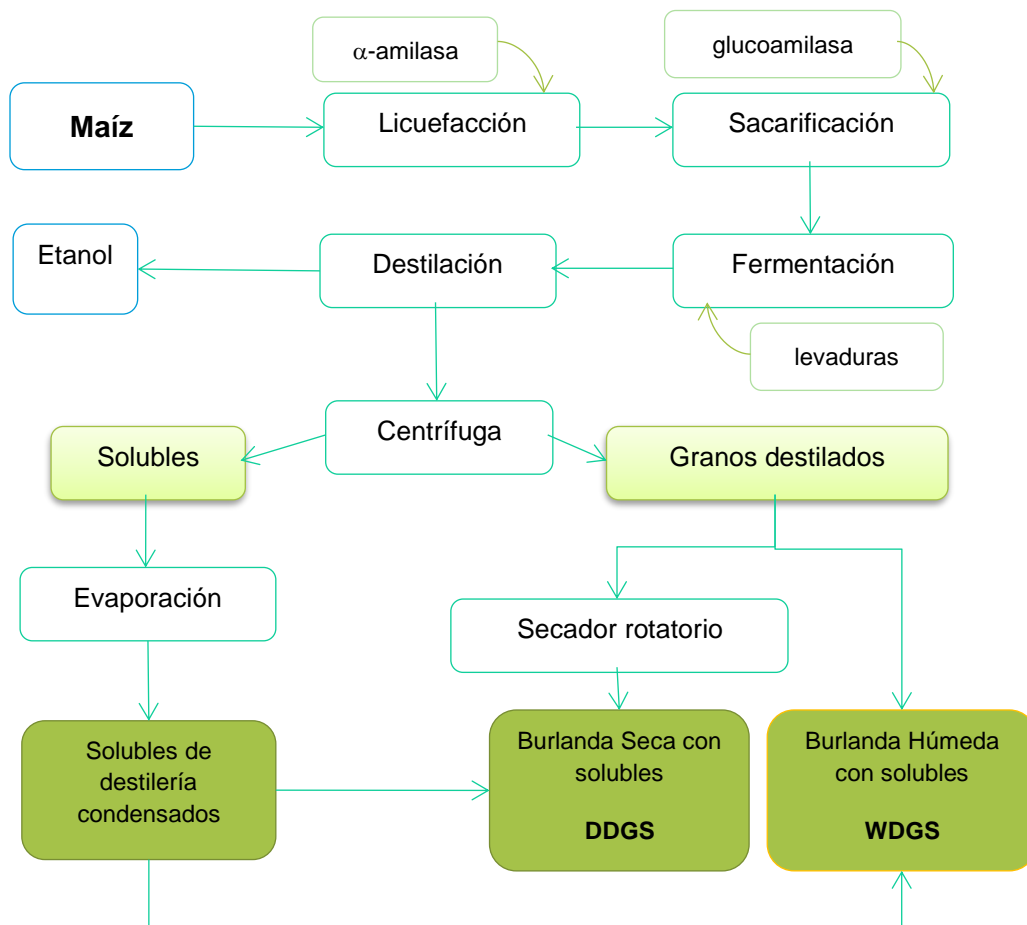
de producción y el establecimiento de un corte obligatorio del 5 %, tanto en el gasoil como en los diversos tipos de nafta, vigente desde 2010.

En general para la obtención de bioetanol se utilizan cereales: maíz en Argentina y Estados Unidos, trigo en Canadá Occidental y cebada en los países nórdicos europeos (Klopfenstein & Grant, 2003). La producción de etanol a partir de maíz es reciente en Argentina, comenzó en febrero de 2012. El bioetanol producido en su mayor parte provenía de caña de azúcar y en menor proporción a partir de grano de maíz. En diciembre del 2014, el gobierno argentino aumentó el corte de nafta con bioetanol al 10 % y al 12 % en el 2016 cuando la producción de bioetanol rozó los 900.000 m³, de los cuales el 55 % fue de origen maicero y el 45 % azucarero (MINEM, 2017).

Actualmente existen seis plantas de producción de bioetanol a partir de maíz, cuatro en Córdoba (Bio IV, Porta, ACABIO y Promaíz), las dos restantes, se encuentra ubicadas en Avellaneda provincia de Santa Fe (Vicentín) y en Villa Mercedes, provincia de San Luis (Diase). De acuerdo con las medidas de estímulo al consumo y el desarrollo de inversión de las plantas procesadoras la producción de bioetanol mantiene su crecimiento sostenido (Calzada & Ramseyer, 2018).

El proceso industrial de elaboración de bioetanol consiste en convertir los almidones y azúcares de la materia prima inicial en etanol, a través de los procesos de sacarificación y fermentación. Por lo tanto, en el producto final se reduce drásticamente el contenido de hidratos de carbono no estructurales y se concentra proporcionalmente el resto de los elementos nutritivos. De acuerdo con lo propuesto por De Blas et al. (2007) el proceso consta de cinco fases: 1) selección, limpieza y molienda del grano; 2) licuefacción y sacarificación o clivaje del almidón a glucosa; 3) fermentación de la glucosa para producir etanol; 4) destilación del etanol mediante proceso de vaporización por calentamiento; y 5) recolección de los residuos y secado con aire caliente hasta un 10-12 % de humedad, para su posterior comercialización en forma de gránulo (Figura 1.1)

Figura 1.1 Esquema del proceso de producción de etanol a partir de la molienda seca de maíz



La molienda seca del maíz se utiliza para obtener aceite, polenta y harinas; y es también la tecnología de procesamiento comúnmente empleada para obtener bioetanol. Esta molienda utiliza el grano entero, por lo que el proceso demanda menos inversión inicial de capital que la molienda húmeda.

La fermentación del grano genera dos subproductos básicos: una fracción compuesta por grano no fermentado (Granos destilados, GD), y una fracción líquida que contiene levaduras, partículas finas de grano y nutrientes en solución denominada “solubles”. Además, en el proceso se genera anhídrido carbónico que se puede utilizar en bebidas y para congelar carnes.

Los subproductos de la molienda seca varían en cuanto a denominación y calidad de acuerdo con el proceso específico implementado y la materia prima

utilizada. En general, luego de la transformación del grano de maíz se concentran entre 2,2 y 3 veces el contenido en fibra, proteína, extracto etéreo y cenizas, en relación con el grano que le dio origen (Herrera & Jordán , 2010).

De acuerdo con el proceso específico empleado se pueden generar los siguientes subproductos (Erickson et al., 2005):

- *Burlanda húmeda o Granos destilados húmedos con solubles* (GDHS, WDGS-Wet Distillers Grains plus Solubles): compuesta por los GDH con el agregado de los solubles condensados, con un contenido de materia seca entre 31 a 36%.
- *Burlanda seca con solubles o Granos destilados secos con solubles* (GDSS, DDGS-Dry Distillers Grains plus Solubles): fracción formada por la mezcla de los GDS con los solubles condensados, con 85 a 90 % de materia seca.
- Granos destilados húmedos (GDH, o WDG-Wet Distillers Grains): subproducto con elevado contenido de agua compuesto por partículas de grano destilado no fermentado.
- Granos destilados secos (GDS, o DDG-Dry Distillers Grains): el mismo residuo de los GDH sometido a un proceso de secado. El contenido de materia seca se encuentra en el rango de 85-90 %.
- Solubles de destilería condensados (SDC, o CDS-Condensed Distillers Solubles): compuesto por la fracción líquida de la fermentación condensada, formando un jarabe de 25-45 % de materia seca y alto contenido de fósforo (1,57 %) y azufre (0.92 %).

Es importante resaltar que las características de la burlanda obtenida dependen de la calidad de la materia prima y de las condiciones del proceso (Mustafa et al., 2000; Stein & Shurson, 2009). La burlanda húmeda (WDGS), es el subproducto principal en volumen, el más económico a nivel de energía del proceso global, y con mayor valor nutricional. Sin embargo, su incorporación como alimento destinado a los animales enfrenta los mayores desafíos, debido al rápido deterioro y la pérdida de calidad que experimenta la burlanda al ser almacenada (Christensen et al., 2010).

Según lo propuesto por Nyendu (2011) los mecanismos de deterioro de burlanda, responden a un complejo sistema de interacciones entre los microorganismos presentes y las condiciones ambientales. Este proceso no es independiente de la calidad del grano de cereal que le dio origen.

Las propiedades físicoquímicas de la WDGS como el contenido de humedad cercano al 60 % (en base húmeda) y la actividad del agua de 1,00 explican su rápido deterioro por el desarrollo de microorganismos (Gallardo, 2005; Rosentrater & Lehman, 2008). Con relación a ello, la determinación de las propiedades térmicas (conductividad, resistividad y difusividad), densidad aparente, color, pH, proteína, fibra, grasa y ceniza, son parámetros importantes tanto para el diseño de instalaciones y equipos de almacenamiento como para estimar el grado de deterioro o tiempo de almacenamiento (Tjardes & Wright, 2002).

Estudios llevados a cabo han demostrado la corta vida útil de la burlanda húmeda en los establecimientos ganaderos cuando es expuesta al oxígeno (Christensen et al., 2010; Harding, 2012; Bragachini et al., 2014). Por este motivo resulta importante encontrar alternativas de control del deterioro que no requieran una gran inversión económica ni de proceso, para fomentar su uso a nivel regional como componente de la ración en la alimentación animal y asegurar en cada eslabón de la cadena su calidad nutricional e inocuidad.

Las evaluaciones del agregado en burlanda húmeda de sustancias químicas preventivas del deterioro, han dado resultados promisorios (Kung, 2008; Walker & Foster, 2008). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento el efecto en la calidad de WDGS durante el almacenamiento, al aplicar tratamientos químicos y biológicos para el control de hongos y bacterias, en condiciones locales de producción.

2. HIPÓTESIS

En relación a lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis en este trabajo de tesis:

La aplicación de productos de control de bacterias y hongos en burlanda húmeda de maíz, mantendrá su calidad e inocuidad durante el almacenamiento para ser destinada a la alimentación animal.

3. OBJETIVOS:

Objetivo general

Evaluar la calidad durante el almacenamiento de burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos de control de hongos y bacterias para ser destinada a alimentación animal.

Objetivos específicos

- Valorar la calidad física de la burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos como indicadores sencillos de cambios durante el almacenamiento.
- Evaluar la calidad química de burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos a fin de establecer su valor como componente en la dieta animal.
- Evaluar la calidad sanitaria de la burlanda húmeda de maíz con distintos tratamientos como indicador de su inocuidad alimentaria.
- Identificar las variables de calidad durante el almacenamiento para establecer la ventana de uso de burlanda como alimento animal.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUCCIÓN

La burlanda, subproducto de la extracción de etanol a partir de maíz, es un alimento destinado a la alimentación animal de elevado aporte nutricional (Rosentrater & Lehman, 2008; Ahern et al., 2016; Aristizabal Rivera, 2017). Es de destacar que, en el proceso de transformación, luego de la separación del almidón, los nutrientes que permanecen se concentran hasta tres veces en relación al grano de maíz utilizado como materia prima (Stock et al., 2000). De esta manera, la burlanda como alimento animal resulta una fuente económica de proteínas y energía (Loy & Strohbahn, 2007; Kinman et al., 2011).

En particular la burlanda húmeda representa beneficios sobre la seca, ya que conserva su valor nutricional al evitar los tratamientos de calor para su deshidratación (Kinman et al., 2011). Sin embargo, el subproducto húmedo tiene la limitante que se deteriora durante el almacenamiento con la subsecuente pérdida de calidad.

Estudios realizados han informado que una vez que este subproducto llega a los establecimientos ganaderos y es almacenado expuesto al oxígeno, su vida útil se acorta. El deterioro puede ocurrir dentro de unos pocos días en función de la cantidad de exposición al oxígeno y la temperatura del ambiente (Christensen et al., 2010). Según lo informado por García & Kalscheur (2004) en las condiciones de Dakota del Sur (EEUU), cuando los granos de destilería salen de la planta de producción y son trasladados a los campos para ser suministrados a los animales, su conservación se limita a 3 o 4 días en verano y hasta 1 semana en invierno si no son almacenados al vacío. Por su parte, Harding (2012) sostiene que el deterioro ocurre entre los 3 a 14 días cuando la burlanda permanece expuesta al aire en Nebraska (EEUU).

La actividad enzimática y el desarrollo de microorganismos se propician en la superficie de las pilas de burlanda húmeda en presencia de oxígeno y temperaturas cálidas (Klopfenstein et al., 2008; Christensen et al., 2010). La burlanda al tener pequeñas partículas (densidad entre 800 y 1.000 kg/m³) sufre escasas transformaciones en el interior de la masa almacenada, si el material permanece con la conformación original sin ocasionarle ningún movimiento y el principal deterioro se produce en la capa superficial (De León et al., 2015).

Diferentes estudios se han llevado a cabo para evaluar el potencial de almacenamiento de la burlanda húmeda sola, en mezcla con diferentes forrajes y con diferentes sistemas (silo bolsa, bunker y pilas) (García & Kalscheur, 2006; Erickson et al., 2008; Christensen et al., 2010). Estos autores sostienen que todo tipo de estructura que disminuya el contacto con el aire disminuye el deterioro de la burlanda. Debe considerarse el elevado costo que implica almacenarla, en relación a la disponibilidad de otros alimentos que puedan reemplazarla sin estos requerimientos y la distancia al trasladarla desde la planta de elaboración (Echeverría, 2016).

En relación a las modificaciones en la burlanda durante el almacenamiento, Christensen et al. (2010) estableció cambios físicos en el color y la textura, con pérdida de materia seca a los 56 días de almacenada. Los estudios llevados a cabo por Nyendu (2011), sugieren que la vida útil de la burlanda como alimento animal corresponde al periodo en el cual las pérdidas de materia seca comienzan a ser significativas. Este criterio comercial no refleja totalmente los cambios experimentados en el alimento, por lo cual la evaluación en burlanda de atributos físicos de fácil determinación, contribuirían a la estimación de su calidad durante el almacenamiento. En relación a ello, Ramírez-Ramírez et al. (2011) sostienen que las variaciones de pH serían una variable sensible de respuesta a los procesos de fermentación característico del crecimiento microbiano durante al almacenamiento de la burlanda.

Los controles de calidad físicos del alimento permiten prever aspectos importantes sobre la respuesta alimentaria en los animales como: palatabilidad, consumo, digestibilidad, eficiencia nutricional entre otros (Cromwell et al., 1993). Mosqueda et al. (2013) informaron acerca de la importancia de establecer

características físicas en burlanda a fin de poder relacionarlas con la calidad, ya que ésta es muy variable y depende de varios factores. Entre ellos, resultan importantes: 1) la variedad del grano original, las condiciones de manejo y ambientales del cultivo, 2) el proceso tecnológico de la planta productora de etanol (tipo de molienda, grado de extracción del almidón, aditivos utilizados en el proceso de fermentación tanto para acelerar el proceso como para finalizarlo y la temperatura y las características de la destilación ejecutada), 3) el tipo de subproducto resultante de la planta (granos de destilería húmedos, o secos, condensados solubles, o mezclas de granos de destilería con condensados solubles), y 4) condiciones de transporte, logística, conservación y almacenaje de los subproductos (Bruni et al., 2014).

En cuanto a la composición química, de la burlanda se caracteriza por su gran valor nutricional. El almidón comprende aproximadamente dos tercios del grano de maíz y se elimina casi por completo durante el proceso de molienda seca al fermentar el almidón para producir etanol, a la vez que se concentran los nutrientes remanentes, entre ellos proteína, grasa, fibra y fósforo hasta tres veces en comparación con el maíz del que proceden (Stock et al., 2000; Kalscheur et al., 2008). Se ha descrito que estos aumentos pueden ser variables en las distintas partidas en una planta elaboradora de etanol, evidenciándose diferencias entre plantas (Shurson & Noll, 2005). Poder establecer las características físicas y químicas de la WDGS contribuye al control de proceso, diseño de equipos e instalaciones y al manejo, almacenamiento y utilización como componente de la dieta animal (Tjardes & Wright, 2002; Rosentrater & Lehman, 2008).

Respecto a la composición química, estudios realizados en burlanda húmeda (WDGS) por Rosentrater & Lehman (2008) y Kalscheur et al. (2003) informaron en promedio un contenido de 28.9 % de proteínas, 6.6 % de fibra, 12.4 % de grasa y 5.1 % de cenizas. Mientras que en burlanda seca, menor proporción de cada componente fueron encontrados por Erickson et al. (2005) y Spiehs et al. (2002). La WDGS producida en Argentina presenta un contenido de materia seca (MS) alrededor del 33.8 %, aunque varía entre 42,4 % y 25,2 % y el pH es de 4,1 en promedio, con valores máximos y mínimos de 5 y 3,4 respectivamente (Queiroz & Calveyra , 2014; Brunetti et al., 2015).

En relación al tiempo de almacenamiento y la pérdida de la calidad nutricional de la WDGS, Harding et al., (2012) evaluaron un sistema simulado en bunker durante 140 días. A partir de los resultados obtenidos, estos autores concluyeron que el tiempo de almacenamiento no afecta el contenido de grasa, pero disminuye la MS, materia orgánica, FDN y aumenta el pH.

Estudios previos se han realizado en relación al desempeño de conservantes biológicos y químicos para disminuir el deterioro de la burlanda húmeda. Los aditivos biológicos incluyen; heno de hierba, tallo de maíz, paja de trigo y cáscaras de soja. Estos materiales se mezclan en seco con el fin de reducir la humedad de la alimentación húmeda durante e almacenamiento (García & Kalscheur, 2006; Christensen et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la mezcla de alimentos húmedos con inoculante conteniendo una mezcla de bacterias acidolácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri* y *L. casei*) puede mejorar la estabilidad aeróbica de los ensilados (Li et al., 2016). Entre los conservantes químicos el ingrediente activo principal es el ácido propiónico (Nyendu, 2011), el más usado en el mercado de EE. UU., comercialmente reconocidos como CakeGuard™ (Alltech® Inc., EE. UU.), ZeniPro® (Kemin Inc., EE. UU.) y Biomin® (Biomin America Inc., EE. UU.)

Los ensayos con conservantes químicos han indicado que el deterioro en los granos de destilería sin tratamiento fue mayor que en los granos destilados tratados con conservante cuando se almacena al aire libre en cajas abiertas (Walker & Forster, 2008). En este trabajo de tesis se evaluó la actividad preventiva del deterioro al aplicar *Lactobacillus* y dos productos químicos comerciales (Virukill y Salpro 2500) provistos por FUGRAN Comercial e Industrial S.A. Virukill es empleado para la desinfección de instalaciones, superficies, vehículos, equipos, utensilios e instrumentos para el control de granos y Salpro se destina al control de Salmonella y otras bacterias patógenas en alimentos para animales y materias primas.

De acuerdo con lo expuesto se propone para este capítulo abordar los siguientes objetivos:

- Valorar la calidad física de la burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos, como indicadores sencillos de cambios durante el almacenamiento.

- Evaluar la calidad química de burlanda húmeda de maíz con diferentes tratamientos a fin de establecer su valor como componente en la dieta animal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material

Los ensayos se llevaron a cabo con burlanda húmeda proveniente de la empresa Porta Hnos. S.A. provista por la empresa LINCE S.A. Las determinaciones se realizaron durante el año 2016 en el Laboratorio del Centro de Transferencia de Calidad Agroalimentaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

2.2. Muestreo y tratamientos

El material recientemente elaborado y acondicionado en bolsas plásticas, registró una temperatura de 65 °C al momento de la recepción en el laboratorio. La WDGS se dispuso en contenedores plásticos limpios de 13 dm³ de capacidad con una superficie de exposición de 9,75 dm².

Los tratamientos aplicados sobre la burlanda húmeda de maíz se describen en la Tabla 2.1.

Todos los contenedores se mantuvieron durante 21 días en cámara de incubación a 25 °C, con fotoperiodo de 12 hs luz. Los muestreos para las determinaciones de calidad física y química se llevaron a cabo a los 0, 7 y 14 días desde el inicio del ensayo, correspondiéndose al 23, 30 de noviembre y 7 de diciembre. El almacenamiento se extendió hasta los 21 días para coleccionar las muestras destinadas a la determinación de micotoxinas.

Para conformar cada muestra; se tomaron tres alícuotas de cada tratamiento, en diferentes sitios del contenedor con sacabocado. Luego de homogenizadas, las muestras se colocaron en recipientes cerrados para su evaluación.

Tabla 2.1 Tratamientos aplicados a burlanda húmeda de maíz

| Denominación | Tratamiento | Dosis | Modo de aplicación |
|-----------------------------------|---|------------------------|---|
| T0: Testigo | Testigo sin tratamiento | 0 | No aplicación |
| T1: Virukill 2 % | N,N-Didecil-N,N- Cloruro de dimetilamonio (Nombre comercial: Virukill) | 2,45 ml/m ² | Pulverización en superficie |
| T2: Virukill 5 % | N,N-Didecil-N,N- Cloruro de dimetilamonio (Nombre comercial: Virukill) | 6,12 ml/m ² | Pulverización en superficie |
| T3: Virukill 2 % con reaplicación | N,N-Didecil-N,N- Cloruro de dimetilamonio (Nombre comercial: Virukill) | 2,45 ml/m ² | Pulverización en superficie al inicio del ensayo y a los 7 días |
| T4: <i>Lactobacillus</i> | Suspensión de <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. buchneri</i> | 10 ⁶ UFC/g | Incorporación en la masa de burlanda |
| T5: Salpro | Ácido fórmico+Ácido propiónico+Formiato de amonio (Nombre comercial: Salpro 2500) | 76,5 ml/m ² | Pulverización en superficie |

2.3. Calidad física de la burlanda húmeda de maíz

Color

Para la determinación visual de los posibles cambios en el color de las muestras de burlanda durante el almacenamiento, se empleó la escala SRM (Standard Reference Method) (Figura 2.1). La elección de esta escala se basó en el grado de coincidencia de los colores con los de la masa de burlanda, lo que facilitó su determinación.

Figura 2.1 Escala de color Standard Reference Method (SRM) aplicada a la evaluación de burlanda húmeda.

| SRM | Beer Color | EBC |
|-----|---|-----|
| 2 |  | 4 |
| 3 |  | 6 |
| 4 |  | 8 |
| 6 |  | 12 |
| 8 |  | 16 |
| 10 |  | 20 |
| 13 |  | 26 |

Fuente: Modificada de <http://methods.asbcnet.org/toc.aspx>

Determinación de pH

El valor de pH se estableció de acuerdo al método 981.12 (AOAC, 1990). Se realizó la determinación de pH en una suspensión 50 % P/V de burlanda en agua destilada a 20 °C, con peachímetro HANNA® RS232. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento en cada muestra correspondiente al tiempo de almacenamiento evaluado.

Densidad

Se estableció en base al peso de burlanda que corresponde a un volumen de 100 ml (FAO, 1993). Se registró el peso de un vaso de precipitados de 100 ml vacío, se enrasó con burlanda a 100 ml y se volvió a pesar. La densidad se calculó por diferencia de peso referida al volumen considerado. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y fecha de muestreo. Los resultados se expresaron en g/mL.

Contenido de Humedad

La determinación del porcentaje de humedad se realizó de acuerdo al Método 930.15 (AOAC, 1990). Se pesaron 100 g de muestra dispuesta en bandejas

descartables de aluminio, se colocaron en estufa durante 48 hs a 60 °C. Posteriormente se dejaron enfriar en cámaras de desecación y una vez alcanzada la temperatura ambiente se volvieron a pesar. Se calculó el contenido de agua teniendo en cuenta la diferencia de peso. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje en base húmeda.

2.4. Calidad química de la burlanda húmeda de maíz

La caracterización química de la WGDS se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes determinaciones:

Contenido de proteína bruta (PB)

La determinación de PB se llevó a cabo con espectrofotómetro infrarrojo cercano (NIR) (Rivera Rivera & Maldonado, 2017; Romero, 1997). Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada tratamiento y fecha de almacenamiento evaluada. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Contenido de grasa

El contenido de extracto etéreo de las muestras se estableció por el método de Soxhlet o Método 7.045 (AOAC, 1986). Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado para cada tratamiento y periodo de almacenamiento evaluado. Los resultados se expresaron como porcentaje de grasa en base al peso seco.

Contenido de materia seca

La determinación del contenido de materia seca (MS) como indicador de deterioro se realizó por gravimetría. Se tomaron muestras de 5 gr y se colocaron en

estufa a 60 °C durante 48 horas (Bruno et al., 1995). Posteriormente se enfriaron en cámaras de desecación hasta temperatura ambiente para ser pesadas. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado para cada tratamiento y fecha de almacenamiento. Los resultados se expresaron en porcentaje.

2.5. Diseño y Análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques completos al azar. Las variables de calidad física y química evaluadas en burlanda se sometieron a un análisis ANOVA ($p < 0,05$) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Para la comparación de medias se aplicó Tukey ($p < 0,05$). Se utilizó el software INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2011).

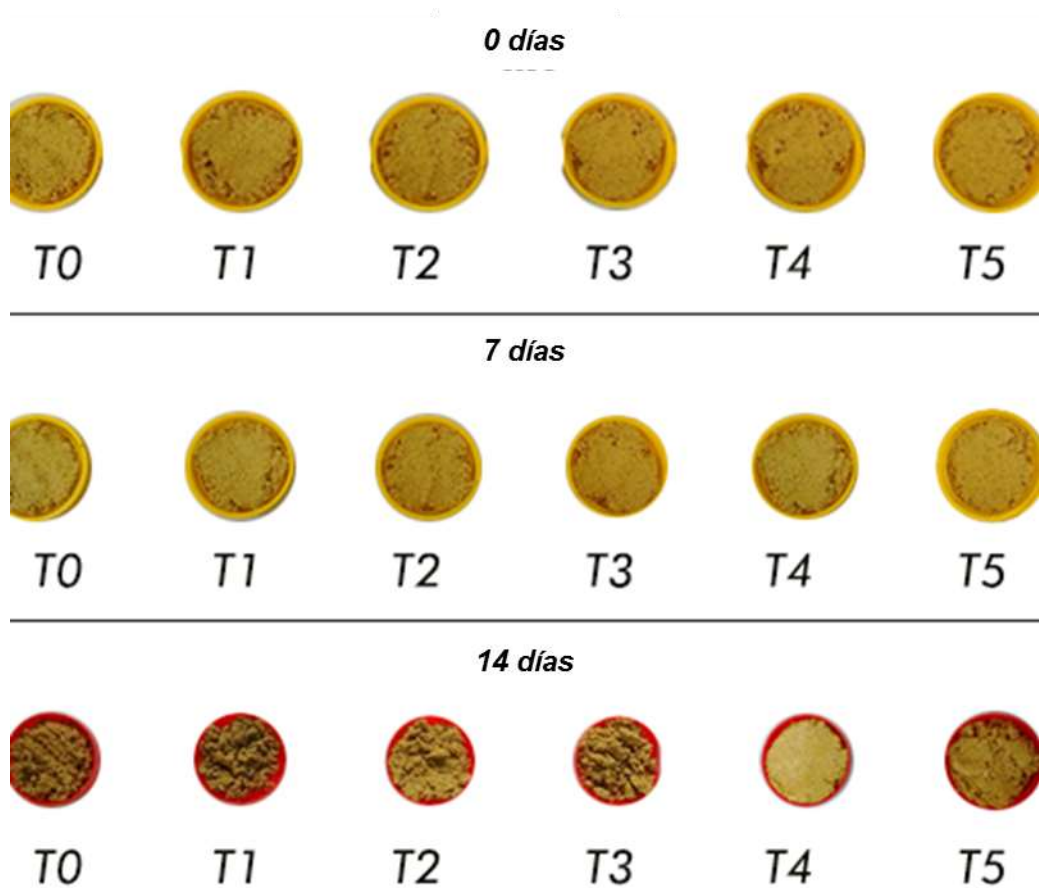
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Calidad Física

Color

El color como atributo de la calidad física de WGDS durante el almacenamiento se presenta en la Figura 2.2.

Figura 2.2 Color de burlanda húmeda con diferentes tratamientos durante el almacenamiento



T0: testigo, **T1:** Virukill 2%, **T2:** Virukill 5%, **T3:** Virukill 2% c/reaplicación, **T4:** *Lactobacillus*, **T5:** Salpro

La cuantificación de las observaciones visuales llevadas a cabo, de acuerdo con la escala SRM, se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Color en valores SRM de burlanda húmeda con diferentes tratamientos durante el almacenamiento

| Tratamiento | Período de almacenamiento | | |
|--------------------------------|---------------------------|--------|---------|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0: Testigo | 6 | 7 | 8 |
| T1: Virukill 2% | 6 | 7 | 8 |
| T2: Virukill 5% | 6 | 7 | 8 |
| T3: Virukill 2% c/reaplicación | 6 | 7 | 8 |
| T4: <i>Lactobacillus</i> | 6 | 6 | 7 |
| T5: Salpro | 6 | 7 | 7 |

De acuerdo al SRM, si bien el valor inicial fue el mismo entre tratamientos, a medida que transcurrieron los días de almacenamiento se observó una tendencia a aumentar. No se detectó variación en los tratamientos testigo y Virukill, con diferentes dosis e inclusive reaplicación. Mientras que *Lactobacillus* y Salpro, el cambio de coloración se retrasó, con mejor respuesta en el primero.

Conforme a lo sugerido por Gallardo (2005) el color de la WDGS para ser aceptable debería ser amarillo suave a naranja ligero y de tonos brillantes. Mientras que material marrón heterogéneo, opaco y con focos negros o blancos es rechazado como alimento animal. Por su parte, Donkin (2008) sostiene que el color amarillo dorado en burlanda, está asociado a más alta digestibilidad y palatabilidad, mientras que un color marrón indicaría una menor digestibilidad. Los resultados encontrados en este trabajo de tesis indican que los colores oscuros corresponden a los tratamientos testigo y Virukill a los 14 días de almacenamiento. Mientras que la aplicación de *Lactobacillus* conservó coloraciones claras y brillantes en la burlanda, aún hasta el final del ensayo. Las observaciones en este trabajo en concordancia con lo informado por otros investigadores, sugiere que el atributo color es un parámetro a tener en cuenta como indicador de calidad de WDGS.

pH

En la Tabla 2.3 se presentan los datos obtenidos en la determinación de pH de las muestras de WDGS durante el almacenamiento con distintos tratamientos.

Tabla 2.3 pH de burlanda húmeda durante el periodo de almacenamiento con distintos tratamientos

| Tratamiento | Periodo de almacenamiento | | |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0: Testigo | 5,17 ±0,00 _A | 4,79 ±0,01 _B | 5,09 ±0,03 _A |
| T1: Virukill 2% v/v | 5,17 ±0,01 _A | 4,90 ±0,02 _B | 4,68 ±0,00 _C |
| T2: Virukill 5% v/v | 5,14 ±0,02 _A | 4,73 ±0,05 _B | 4,69 ±0,00 _B |
| T3: Virukill 2% v/v c/reaplicación | 5,10 ±0,01 _A | 4,73 ±0,07 _B | 4,73 ±0,01 _B |
| T4: <i>Lactobacillus</i> | 5,05 ±0,01 _A | 4,65 ±0,00 _C | 4,96 ±0,00 _B |
| T5: Salpro | 4,85 ±0,01 _A | 4,88 ±0,01 _A | 4,57 ±0,01 _B |

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones. Valores medios seguidos de letras iguales indican diferencias no significativas entre los periodos de almacenamiento Tukey ($p < 0,05$).

Los valores de pH en general para todos los tratamientos evaluados mostraron una tendencia a disminuir a medida que transcurren los días de almacenamiento de la burlanda. Estos resultados coinciden a lo que sostienen Ramírez-Ramírez et al. (2011) quienes informaron una variación de pH en respuesta a los procesos de fermentación durante el almacenamiento. Es de destacar que los registros se encuentran dentro de lo normal para burlanda húmeda, con valores alrededor de 5 de acuerdo a lo propuesto por Kurtzman (2006).

Densidad

Los resultados de la determinación de densidad de la WDGS durante el almacenamiento con distintos tratamientos se presentan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Densidad de burlanda húmeda (g/mL) durante el almacenamiento, con diferentes tratamientos

| Tratamiento | Periodo de almacenamiento | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0: Testigo | 1,04 ± 0,004 _A | 0,98 ± 0,000 _B | 0,96 ± 0,030 _B |
| T1: Virukill 2% v/v | 1,04 ± 0,003 _A | 0,98 ± 0,001 _B | 1,01 ± 0,035 _B |
| T2: Virukill 5% v/v | 1,05 ± 0,013 _A | 1,01 ± 0,005 _B | 1,01 ± 0,003 _B |
| T3: Virukill 2% v/v c/reaplicación | 1,05 ± 0,003 _A | 0,99 ± 0,004 _B | 1,00 ± 0,024 _B |
| T4: <i>Lactobacillus</i> | 1,02 ± 0,030 _A | 1,00 ± 0,015 _B | 1,00 ± 0,003 _B |
| T5: Salpro | 1,04 ± 0,004 _A | 0,99 ± 0,002 _B | 0,99 ± 0,005 _B |

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones. Valores medios seguidos de letras iguales indican diferencias no significativas entre los periodos de almacenamiento Tukey ($p < 0,05$).

Los valores de densidad de la WDGS durante el almacenamiento mostraron una disminución a los 7 días de iniciado el ensayo para mantenerse sin diferencias significativas hacia los 14 días. Este comportamiento se observó en el testigo y en todos los tratamientos evaluados.

Es de destacar que, los valores promedio observados de densidad en todos los casos son comparables a los publicado por Rosentrater & Lehman (2008) y Sarturi (2013) para burlanda húmeda de maíz.

Contenido de humedad

El contenido de humedad en burlanda húmeda almacenada con diferentes tratamientos se presenta en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Porcentaje de humedad de la burlanda húmeda durante el almacenamiento con distintos tratamientos.

| Tratamiento | Periodo de almacenamiento | | |
|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0: Testigo | 53,74 ±0,34 _A | 53,17 ±0,85 _A | 56,84 ±1,47 _A |
| T1: Virukill 2% v/v | 55,79 ±0,04 _A | 53,38 ±0,68 _A | 57,66 ±2,07 _A |
| T2: Virukill 5% v/v | 56,35 ±0,02 _A | 54,51 ±2,06 _A | 56,63 ±0,65 _A |
| T3: Virukill 2% v/v c/reaplicación | 56,39 ±0,02 _A | 56,63 ±1,06 _A | 57,21 ±0,98 _A |
| T4: <i>Lactobacillus</i> | 61,16 ±0,25 _A | 62,40 ±1,33 _A | 63,17 ±1,73 _A |
| T5: Salpro 2500 | 56,96 ±0,03 _A | 56,24 ±2,22 _A | 57,19 ±0,64 _A |

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones. Valores medios seguidos de letras iguales indican diferencias no significativas entre los periodos de almacenamiento. Tukey ($p < 0,05$).

El contenido de humedad de burlanda húmeda sin tratamiento no registró cambios estadísticamente significativos durante el periodo de almacenamiento evaluado y en las condiciones ensayadas.

La aplicación de Virukill en las distintas concentraciones empleadas, así como con la reaplicación del producto no ocasionó variaciones en el contenido de humedad. El mismo comportamiento se observó con la aplicación de Salpro o el agregado de *Lactobacillus* durante el periodo evaluado. Según los registros, el contenido de humedad de la muestra con *Lactobacillus* (T4) presenta un contenido de humedad del 62,24% en promedio durante el almacenamiento, ya que se utilizó mayor volumen de agua para su incorporación respecto a los otros tratamientos.

Los valores de humedad registrados están dentro del rango establecido para burlanda húmeda y son similares a los presentados por Rosentrater & Lehman (2008). Es importante tener en cuenta que los elevados valores de humedad registrados contribuyen al corto periodo de conservación de la WDGS (Bragachini et al., 2014).

Es importante resaltar que la información disponible en su mayoría, aborda el análisis de la composición química y el comportamiento de la burlanda seca que es la de importancia comercial a nivel internacional. No se hallaron publicaciones,

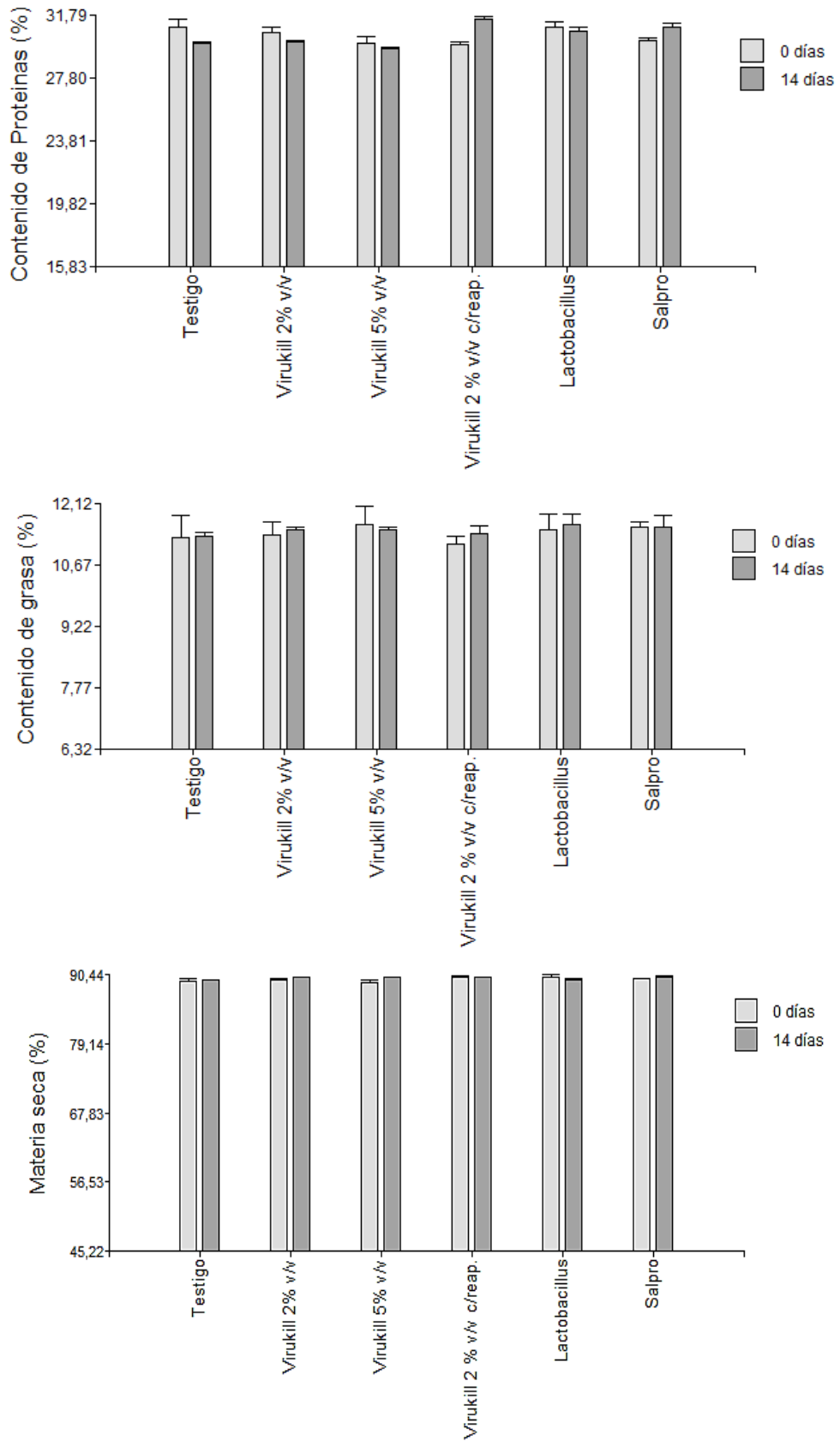
comparables a nuestro trabajo, de otros investigadores respecto al efecto del almacenamiento sobre el contenido de humedad de la burlanda húmeda. Aunque, sí se conoce que el elevado porcentaje de humedad presente en este subproducto se relaciona directamente con la corta vida útil de la burlanda húmeda en los establecimientos ganaderos cuando es expuesta al oxígeno (Bragachini et al., 2014).

En base a los parámetros físicos medidos en términos de pH, densidad y humedad no resultarían indicadores sensibles de deterioro en burlanda húmeda, ya que no evidenciaron diferencias en el periodo evaluado. Sin embargo, el color mediante determinación visual al emplear una escala sencilla de comparación mostró diferencias durante el almacenamiento, característica que debería ser considerada como posible indicador de calidad.

3.2. Calidad química de la burlanda húmeda de maíz

Los resultados en relación al contenido de proteína, grasa y materia seca de WDGS con distintos tratamientos durante el almacenamiento se presentan en la Figura 2.3. Los valores registrados concuerdan con los informados por Arroquy et al. (2014) y Di Lorenzo (2013) y reflejan el aporte nutricional en la dieta animal (Kleinschmit et al., 2006; Rosentrater & Lehman, 2008; Ahern et al., 2016; Aristizabal Rivera, 2017).

Figura 2.3 Contenido de proteína, grasa y materia seca de burlanda húmeda de maíz a los 0 y 14 días de almacenamiento



En el periodo evaluado no se observaron variaciones de la calidad química medida en térmicos de proteína, grasa y materia seca. A consecuencia de ello, la calidad como alimento animal de la WDGS permaneció constante hasta los 14 días de almacenada, en concordancia con lo propuesto por Di Lorenzo (2013). En particular, la cantidad de materia seca constante durante el almacenamiento fue observada por Christensen et al., (2010). Es importante tener en cuenta que la valoración nutricional de la burlanda depende no solo de su composición, sino también de su variabilidad en el tiempo (Liu et al., 2000; Arroquy et al., 2014).

Algunos estudios sugieren que la burlanda seca presenta ventajas respecto a la capacidad de almacenamiento y el costo de transporte (Bragachini et al., 2014; Brunetti et al., 2015). Sin embargo, Arroquy et al. (2014) sostienen que durante el secado se pueden producir alteraciones de la calidad nutricional por sobrecalentamiento (reacciones de Maillard), lo que ocasionaría variaciones de color y digestibilidad (Robinson et al., 2008). Cabe destacar que los cambios de color detectados en la burlanda húmeda en el tratamiento testigo y con Virukill a los 14 días de almacenamiento, no estarían asociados a cambios en la composición nutricional de acuerdo a los datos presentados (Figura 2.3).

4. CONCLUSIONES

No se identificaron efectos significativos de deterioro, en relación a sus propiedades físicas y químicas, en burlanda húmeda de maíz almacenada en las condiciones evaluadas.

Entre los parámetros físicos, la densidad no evidenció cambios desde los 7 días de almacenamiento. Mientras que el pH disminuyó en respuesta a los procesos fermentativos y siempre dentro de los valores normales. Hacia los 14 días de almacenamiento hubo un incremento en la coloración, sin asociación a la transformación de proteínas.

Respecto a la composición química, no hubo cambios en el contenido de proteínas, grasas ni materia seca, de lo que se deduce que durante el periodo evaluado la calidad nutricional (en términos de contenido de grasas, proteína y materia seca) no se modificó.

CAPÍTULO 3

1. INTRODUCCIÓN

La inclusión de burlanda en la dieta destinada a los animales, es una práctica de alta eficiencia respecto al suministro de granos (Nyendu, 2011). En relación a ello se han llevado a cabo estudios con resultados promisorios en vacas lecheras (Anderson et al., 2006; Queiroz & Calveyra, 2014), en la cría y engorde de machos Holando (Gil & Casagrande, 2016), en la producción de carne de cerdo (Stein & Shurson, 2009), y en sistemas de feedlots para producción de carne bovina (Farlin, 1981; Firkins et al., 1985; Schoonmaker et al., 2010).

La burlanda puede ser suministrada en forma seca y húmeda, y si bien la seca tiene menor costo de transporte y es de fácil distribución en los comederos, su composición nutricional y digestibilidad puede disminuir por los tratamientos de sobrecalentamiento durante la elaboración (Robinson et al., 2008). Mientras que en la burlanda húmeda (WDGS) esto no sucede (Kinman et al., 2011), aunque presenta limitaciones en su manejo y aprovechamiento como componente de la dieta destinada a animales debido al elevado contenido de agua (Bragachini et al., 2014). El proceso de deterioro de la WDGS se desencadena cuando llega al campo y permanece expuesta al oxígeno (Kalscheur & Garcia, 2005; Christensen et al., 2010; Harding, 2012; Bragachini et al., 2014; Alvarez et al., 2019).

Las evaluaciones realizadas en las condiciones ambientales de EEUU por Christensen et al. (2010) y Klopfenstein & Erickson (2010), han reportado que la actividad enzimática y el desarrollo de microorganismos se propician en las pilas de WDGS en presencia de oxígeno y temperaturas cálidas. Al respecto Nyendu (2011) sostiene que los microorganismos presentes en la WDGS y las condiciones ambientales a la que se expone explican los mecanismos de deterioro. Además, este proceso no es independiente de la calidad del grano de cereal que le dio origen (Bragachini et al., 2014; Casini, 2015).

Las propiedades físicoquímicas de la WDGS como el contenido de humedad cercano al 60 % (en base húmeda) y la actividad del agua de 1,00 explican su rápido deterioro por el desarrollo de microorganismos (Gallardo, 2005; Rosentrater & Lehman, 2008). Las evaluaciones del agregado en burlanda húmeda de sustancias químicas preventivas del deterioro, han dado resultados promisorios (Kung, 2008; Walker & Foster, 2008). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento el efecto en la calidad de WDGS durante el almacenamiento, al aplicar tratamientos químicos y biológicos para el control de hongos y bacterias, en condiciones locales de producción.

El periodo de almacenamiento considerado actualmente como adecuado para los granos de destilería, se basa en la pérdida de materia seca de acuerdo a una concepción económica. Sin embargo, debería establecerse el periodo de vida útil durante el cual el alimento resulta inocuo para ser consumido por los animales, sin repercusiones negativas sobre el ser humano como destinatario final. Estudiar la dinámica microbiológica en la WDGS es fundamental para establecer el grado de deterioro y los efectos deletéreos por micotoxinas en el subproducto de la fabricación de etanol destinado a la alimentación animal.

Entre las consecuencias de la contaminación con microorganismos, cabe destacar el riesgo para la salud que representan las micotoxinas en los alimentos destinados a la producción animal (Butkeraitis et al., 2008; Zain, 2011). Las micotoxinas definidas como metabolitos secundarios con potencial para causar toxicosis se identifican como sustancias de gran estabilidad química, resistentes a altas temperaturas, al almacenamiento prolongado y procesamiento (Soriano del Castillo, 2007). En la WDGS las micotoxinas están presentes principalmente debido a que los granos utilizados como materia prima están contaminados y durante el proceso de fermentación o secado dichas sustancias no se metabolizan (Liu, 2011). Además, es importante tener en cuenta, que la concentración de micotoxinas presentes en el grano se triplica en los granos de destilería (Vergagni, 2004; Arroquy et al., 2014).

Entre las micotoxinas potencialmente riesgosas presentes en maíz se destacan como las más perjudiciales las aflatoxinas (AF) producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Soriano del Castillo, 2007; Arroquy et al., 2014).

La acción genotóxica y tumorigénica de las aflatoxinas radica en la formación de enlaces covalentes con la base nitrogenada Guanina del ADN celular.

La aflatoxina B1 (AFB1) es metabolizada a aflatoxina M1 (AFM1) en el animal; se ha detectado en leche la presencia de AFM1, que no se desnaturaliza en los procesos de pasteurización, e inclusive puede ser transferida desde la leche cruda a diferentes productos lácteos (Gimeno, 2004; Butkeraitis et al., 2008). De acuerdo a lo expuesto por algunos autores, hasta el momento no se disponen de estrategias tecnológicas que disminuyan la AFM1 en leche, por lo que se recomienda la prevención, eliminando directamente la presencia de AFB1 de la dieta de los animales.

Otro grupo de micotoxinas de riesgo es el de las zearalenonas (ZEA) producidas por el hongo *Fusarium*. Comúnmente detectada en nuestro país, en maíz y en alimentos destinados a animales (Zinedine & Soriano, 2007). La ZEA es parcialmente metabolizada en el rumen convirtiéndose en α -zearalenol que tiene una importante actividad estrogénica, que afecta principalmente la reproducción de los animales (De María et al., 2017).

Se propone como objetivo de este capítulo evaluar la calidad sanitaria de la burlanda húmeda de maíz con distintos tratamientos como indicador de su inocuidad alimentaria.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los tratamientos aplicados en burlanda y la toma de muestras se corresponde a la descripción presentada en el Capítulo II de este trabajo de tesis.

2.1. Incidencia de hongos

Se determinó la presencia de hongos potenciales productores de micotoxinas de acuerdo al método de Mathur & Kongsdal (2003) modificado. Para ello se colocaron 2,5 g de burlanda de cada tratamiento sobre papel humedecido con agua destilada estéril, en cajas plásticas cubiertas con bolsas celofán. Se realizaron duplicados de cada tratamiento y se incubaron en cámara a 21 ± 2 °C con 12 hs de luz durante 6 días (Figura 3.1).

Figura 3.1 Condiciones de incubación en cámara para la determinación de incidencia fúngica



Los hongos presentes se clasificaron macro y microscópicamente mediante técnicas comúnmente usadas en micología y con la ayuda de claves (Ellis, 1971;

Mathur & Kongsdal, 2003). Los resultados para cada género fúngico se expresaron en porcentaje, de acuerdo a la siguiente escala: mayor a 75 %, 70-25 % y menor a 25 % de cobertura en la superficie de la caja.

2.2. Recuento de microorganismos Mesófilos Aerobios totales

El ensayo se realizó inmediatamente de tomada la muestra, de acuerdo a la técnica de recuento en placa. A partir de 10 g de WDGS de cada tratamiento, de procedió a preparar una primera dilución en solución fisiológica (10^{-1}). Luego del homogeneizado se realizaron diluciones seriadas de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . De cada dilución se tomó 0,1 ml y se evaluó por duplicado en medio Tripteína Soya Agar (TSA, Laboratorios Britania S.A.) mediante siembra en superficie. Posteriormente las placas fueron incubadas en cámara durante 6 días a 29 °C. Los resultados del valor del recuento en placa se expresaron como UFC de microorganismos aerobios mesófilos por gramo de burlanda (ANMAT, 2014).

2.3. Presencia de micotoxinas

Para cada tratamiento se determinaron los niveles de aflatoxinas totales y zearalenonas presentes en las muestras a los 0 y 21 días de almacenamiento. Se utilizó la técnica de Elisa competitivo-directo (AgraQuant® Romer Labs) rango de cuantificación para el test de aflatoxinas totales de 2 a 20 ppb y el límite de detección 1 ppb; mientras que para zearalenonas el rango de cuantificación fue de 25 a 1000 ppb y el límite de detección 20 ppb. Los resultados se expresaron en ppb.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Incidencia de hongos

La evaluación de la presencia de hongos en burlanda húmeda con distintos tratamientos durante el almacenamiento se presenta en la Figura 3.2.

En la Figura 3.3. se presenta el detalle de algunas observaciones macroscópicas y al microscopio óptico realizadas para identificar a los microorganismos fúngicos.

Figura 3.2 Presencia de hongos en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos



















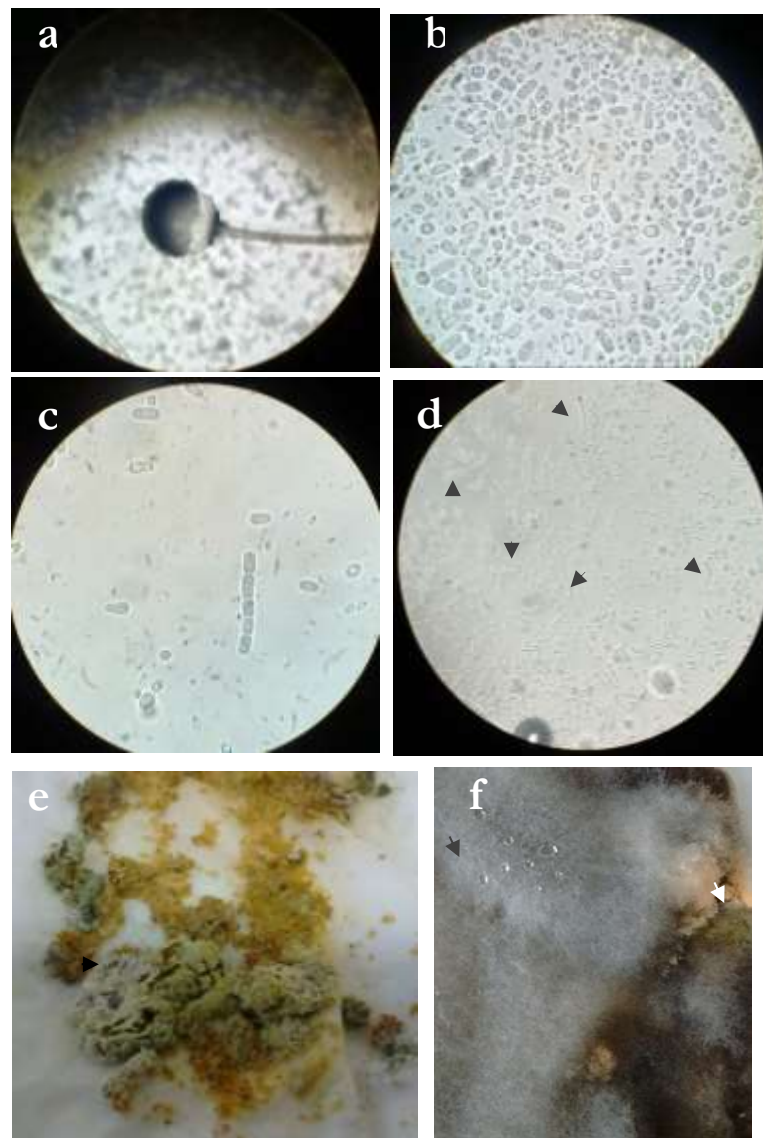
| Tratamiento | Periodo de almacenamiento | | |
|-----------------------------------|---|--|---|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0: Testigo |  |  |  |
| T1: Virukill 2 % |  |  |  |
| T2: Virukill 5 % |  |  |  |
| T3: Virukill 2 % con reaplicación |  |  |  |
| T4: <i>Lactobacillus</i> |  |  |  |
| T5: Salpro |  |  |  |

Figura 3.3 Diferentes hongos presentes en burlanda húmeda almacenada



Referencias: a) conidióforo de *Rhizopus* (400x); b y c) levaduras (400x); d) conidios de *Fusarium*, se indican con flechas (100x); e) observación macroscópica de colonias de *Penicillium* - flecha gris - sobre burlanda húmeda; f) observación macroscópica de *Rhizopus* - flecha gris - y *Aspergillus* - flecha blanca - sobre burlanda húmeda.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 3.1, los hongos detectados son aquellos cuyas formas resistentes sobrevivieron al proceso de elaboración de etanol (Lehman & Rosentrater, 2007). Los géneros detectados fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*. Los tres primeros han sido identificados como micotoxicogénicos y de alto riesgo en la conservación de alimento (Soriano del Castillo, 2007; Zinedine & Soriano, 2007; Lehman &

Rosentrater, 2007; Garcia et al., 2008; Arroquy et al., 2014). Mientras que *Rhizopus*, si bien no ha sido identificado como tal, contribuye al deterioro de granos y cereales durante el almacenamiento debido a su actividad enzimática que degrada las pectinas componentes de la lámina media de las células vegetales (Barkai-Golan, 2001) generando un ambiente de descomposición.

En el tratamiento testigo (T0) en general se observó un aumento en el crecimiento fúngico a medida que transcurre el almacenamiento. Estos resultados coinciden con lo observado por Alvarez et al. (2019) quienes en burlanda húmeda de maíz conservada a 17 °C durante 20 días registraron toda la superficie cubierta de hongos, con presencia de agua libre y olor pútrido. Sin embargo, se contradice con lo propuesto por (Lehman & Rosentrater, 2007), quienes sostienen que bajos valores de pH como resultado del proceso de elaboración de burlanda, logra controlar la presencia de hongos.

Tabla 3.1 Presencia de hongos en burlanda húmeda de maíz con distintos tratamientos durante el almacenamiento

| Almacenamiento | Tratamiento | Género fúngico | | | | |
|----------------|-------------|-----------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| | | <i>A. niger</i> | <i>A. flavus</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Rhizopus</i> |
| 0 días | T0 | xxx | - | x | - | xxx |
| | T1 | xxx | x | x | - | xxx |
| | T2 | xxx | - | x | - | xxx |
| | T3 | xxx | - | x | - | xxx |
| | T4 | - | - | - | - | - |
| | T5 | xx | x | x | - | xxx |
| 7 días | T0 | xx | - | xxx | xx | xx |
| | T1 | xx | x | x | xx | xx |
| | T2 | xxx | x | x | xx | xxx |
| | T3 | xxx | xx | x | x | xxx |
| | T4 | - | - | - | - | - |
| | T5 | x | - | x | - | x |
| 14 días | T0 | xx | xx | xxx | xx | xx |
| | T1 | xxx | xxx | xxx | x | xxx |
| | T2 | xx | xxx | xxx | x | xx |
| | T3 | xx | xxx | xxx | x | xx |
| | T4 | - | - | x | - | - |
| | T5 | x | - | x | - | x |

xxx: >75 % , xx: 50 % , x: <25% de cobertura , -: ausencia

Las aplicaciones de Virukill (T1), con mayor dosis (T2) y reaplicación (T3) no lograron controlar a las especies micotoxigénicas *A. niger*, *A. flavus* y *Penicillium* hacia los 14 días desde almacenamiento (Tabla 3.1). En el caso particular de *Penicillium* alcanza a cubrir más del 75% de la superficie al final del ensayo con estos tratamientos. En general estos resultados se contraponen al efecto fungistático informado por Orlando et al. (2014) al aplicar este producto amoniacal en granos de maíz almacenado. Sin embargo, si concuerda con lo observado para *Fusarium*, cuyo crecimiento se incrementó hacia los 7 días, disminuyendo hacia el final del almacenamiento por debajo de lo observado en el testigo.

La aplicación de Salpro (T5) durante el almacenamiento hasta los 14 días, logró disminuir el crecimiento de *A. niger*, *A. flavus* y *Rhizopus*. No se observó la presencia de *Fusarium* ni siquiera al final del ensayo. Este efecto mejorador al utilizar

mezclas de ácido fórmico como aditivo, fue informado por Siebald et al. (2003) en silajes de pradera, sugiriendo su uso para preservar el alimento destinado a la alimentación animal.

La incorporación de *Lactobacillus* (T4) en burlanda inhibió el crecimiento de *A. niger*, *A. flavus*, *Fusarium* y *Rhizopus* durante todo el ensayo; solo *Penicillium* apareció en menos del 25 % a los 14 días de almacenamiento. Este comportamiento observado se debió a que las bacterias ácido-lácticas (BAL) son altamente competitivas, no solo porque acidifican el medio, sino que además producen sustancias antimicrobianas y antimicóticas (Viera Freitas & Cardozo Orellano, 2016). Así, las bacteriocinas, proteínas producidas por el grupo microbiano BAL, se liberarían al medio y estarían actuando como antagonistas del desarrollo fúngico en las muestras evaluadas de burlanda durante el almacenamiento, de acuerdo al papel funcional de las BAL propuesto por Huertas (2010).

3.2. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales

Los resultados de las determinaciones de microorganismos mesófilos aerobios totales se presentan en la Tabla 3.2.

El recuento de microorganismos mesófilos totales aumenta en todos los tratamientos aplicados a medida que transcurren los días de almacenamiento. El tratamiento con *Lactobacillus* (T4) presentó, durante todo el ensayo, valores superiores al testigo (T0) y a los tratamientos con Virukill (T1, T2 y T3). Este resultado era el esperado debido a la naturaleza del tratamiento aplicado.

Al final del ensayo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, entre los tratamientos con Virukill (T1, T2, T3) y el Testigo; mientras que T4 y T5 se diferencian del resto de los tratamientos presentando menor valor de UFC/g de mesófilos aerobios totales. Lo observado resulta indicativo de la carga microbiana general y orientativo sobre la seguridad potencial de la burlanda para ser empleada en alimentación animal.

Tabla 3.2 Recuento de mesófilos aerobios totales (UFC/g) en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos

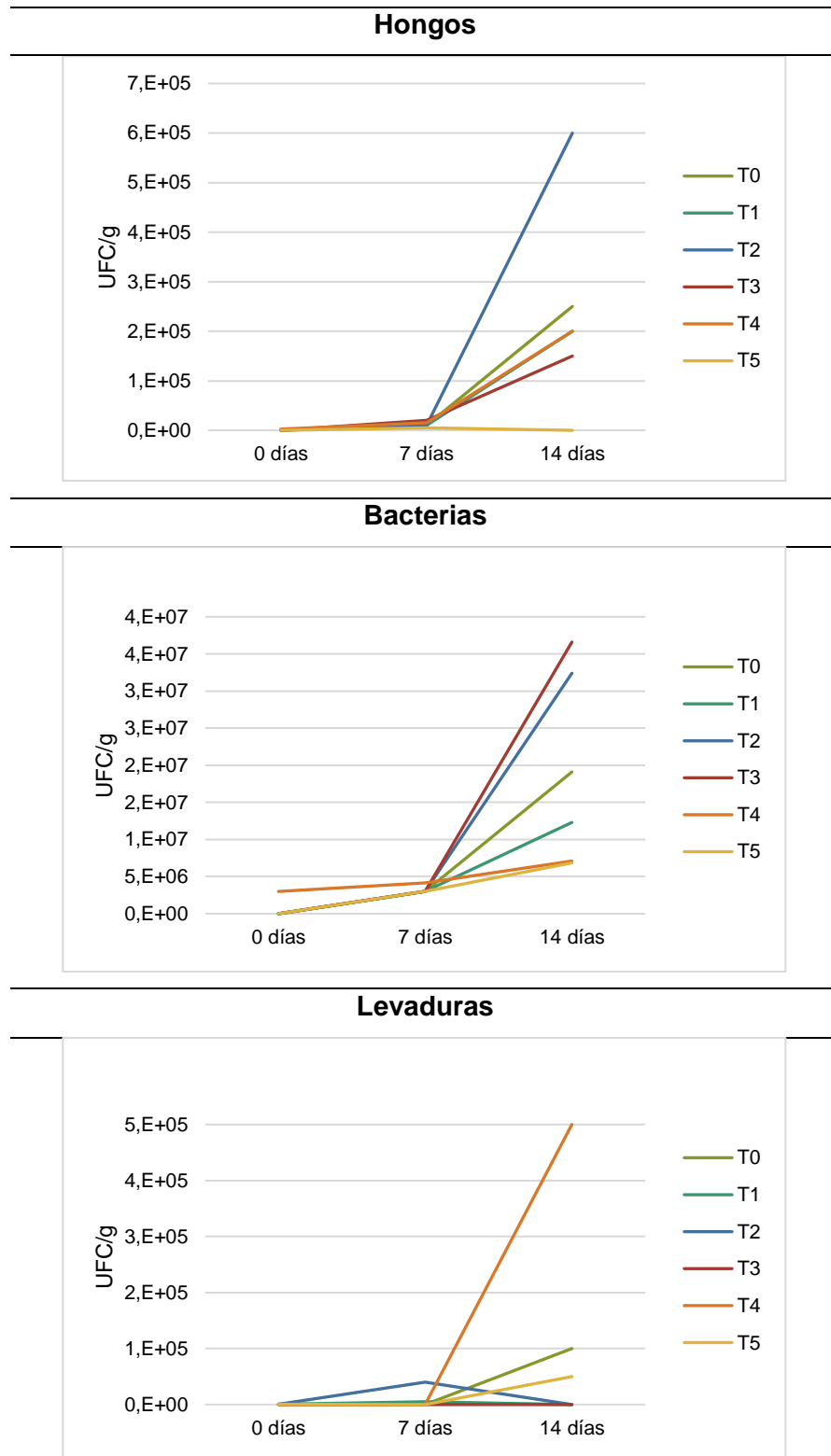
| Tratamientos | Almacenamiento | | |
|-----------------------------|----------------|--------------|--------------|
| | 0 días | 7 días | 14 días |
| T0 Testigo | 6,50 E+02 aA | 3,01 E+06 bA | 1,95 E+07 cA |
| T1 Virukill 2% | 1,50 E+03 aA | 3,02 E+06 bA | 1,25 E+07 cA |
| T2 Virukill 5% | 1,05 E+03 aA | 3,05 E+06 bA | 3,30 E+07 cA |
| T3 Virukill 2% reaplicación | 7,50 E+02 aA | 3,02 E+06 bA | 3,68 E+07 cA |
| T4 <i>Lactobacillus</i> | 3,00 E+06 aB | 4,14 E+06 bB | 7,95 E+06 cB |
| T5 Salpro | 7,50 E+02 aA | 3,01 E+06 bA | 6,85 E+06 cB |

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre días de almacenamiento; letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada periodo de almacenamiento evaluado ($p < 0,05$)

La presencia de hongos, bacterias y levaduras en WDGS durante el almacenamiento, se presenta en la Figura 3.4.

Los valores registrados de microorganismos mesófilos totales, a los 7 días de almacenamiento en todos los tratamientos, superan los recomendados para la comercialización de burlanda húmeda (Codex, 1995; FEDNA, 2012). Si bien recuentos elevados de microorganismos mesófilos totales no son deseables, ya que indican posible contaminación de la materia prima o deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, no están relacionados de manera segura con la presencia de patógenos o sus toxinas en el alimento (ANMAT, 2014). Por lo expuesto se debe complementar esta información con otros ensayos que permitan establecer calidad de burlanda.

Figura 3.4 Hongos, bacterias y levaduras mesófilas presentes en burlanda húmeda almacenada con distintos tratamientos.



Referencias: T0: Testigo; T1: Virukill 2%; T2: Virukill 5%; T3: Virukill 2% reaplicación; T4: *Lactobacillus*; T5: Salpro

3.3. Presencia de micotoxinas

Los resultados del ensayo de micotoxinas en WDGS almacenada con distintos tratamientos se presenta en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Aflatoxinas y zearalenonas en burlanda húmeda de maíz almacenada con diferentes tratamientos

| Tratamientos | Almacenamiento | | | |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | 0 días | | 21 días | |
| | Aflatoxinas ppb/g | Zearalenonas ppb/g | Aflatoxinas ppb/g | Zearalenonas ppb/g |
| T0 Testigo | 4,2 | >1000 | 5,3 | >1000 |
| T1 Virukill 2% | 4 | >1000 | 5,1 | >1000 |
| T2 Virukill 5% | 4,3 | >1000 | 13,7 | >1000 |
| T3 Virukill 2% reaplicación | 4 | >1000 | No detectable | >1000 |
| T4 <i>Lactobacillus</i> | 4,1 | >1000 | 7,3 | >1000 |
| T5 Salpro | 4 | >1000 | No detectable | >1000 |

En todos los tratamientos se detectó presencia de aflatoxinas y zearalenonas al inicio del ensayo. A los 21 días de almacenamiento los valores de aflatoxinas en algunos tratamientos se incrementaron, aunque siempre por debajo del valor máximo de referencia para burlanda (FEDNA, 2012; FAO, 2014). Mientras que la concentración de zearalenonas, excedió el valor máximo de referencia de aptitud para consumo como alimento animal establecido en 100 ppb.

Teniendo en cuenta que el género *Fusarium* no fue predominante en las muestras evaluadas, la contaminación con zearalenona estaría ya presente en el grano de maíz que ingresó a la planta. La presencia de micotoxinas en burlanda recientemente elaborada, estuvo vinculada al hecho de haber ingresado con la materia prima, ya que no se destruyen durante el proceso de elaboración de etanol

aún con las altas temperaturas empleadas y se concentran respecto al grano que le dio origen (Garcia et al., 2008; Liu, 2011).

A los 21 días de almacenamiento, todos los tratamientos aplicados mostraron un nivel de contaminación bajo con aflatoxinas, por debajo del límite (20 ppb). Los niveles de zearalenonas superaron las 1000 ppb en todos los casos, valores altos respecto a lo que sostienen García et al. (2008), quienes informaron que en WDGS los valores rondan los 370 ppb/g en las condiciones de EEUU.

Los productos amoniacales incluidos con Virukill (T1, T2) no lograron disminuir la formación de aflatoxinas, de acuerdo a lo observado por Orlando et al. (2014) en granos de maíz almacenado con dosis similares a las ensayadas. Sin embargo, al reaplicar el producto al 2% (T3) los valores registrados indicaron niveles no detectables. Similar comportamiento se observó en las muestras tratadas con Salpro (T5). Estos resultados no son concluyentes por lo que deberían realizar mayor cantidad de determinaciones al respecto.

4. CONCLUSIONES

En condiciones locales se produce WDGS con hongos micotoxicogénicos, cuya presencia y actividad no disminuyó durante el proceso de elaboración de etanol.

Durante el almacenamiento la aplicación de *Lactobacillus* y Salpro, no permitieron el crecimiento de hongos, disminuyeron la presencia de microorganismos mesófilos totales indicadores de posible deterioro y mantuvieron dentro de los valores aceptados para su consumo.

De lo expuesto se deduce que la vida útil de la WDGS puede extenderse hasta los 14 días, al aplicar de manera sencilla estos productos, los cuales generan condiciones que regulan la dinámica de los microorganismos presentes como indicadores de inocuidad alimentaria.

CAPÍTULO 4

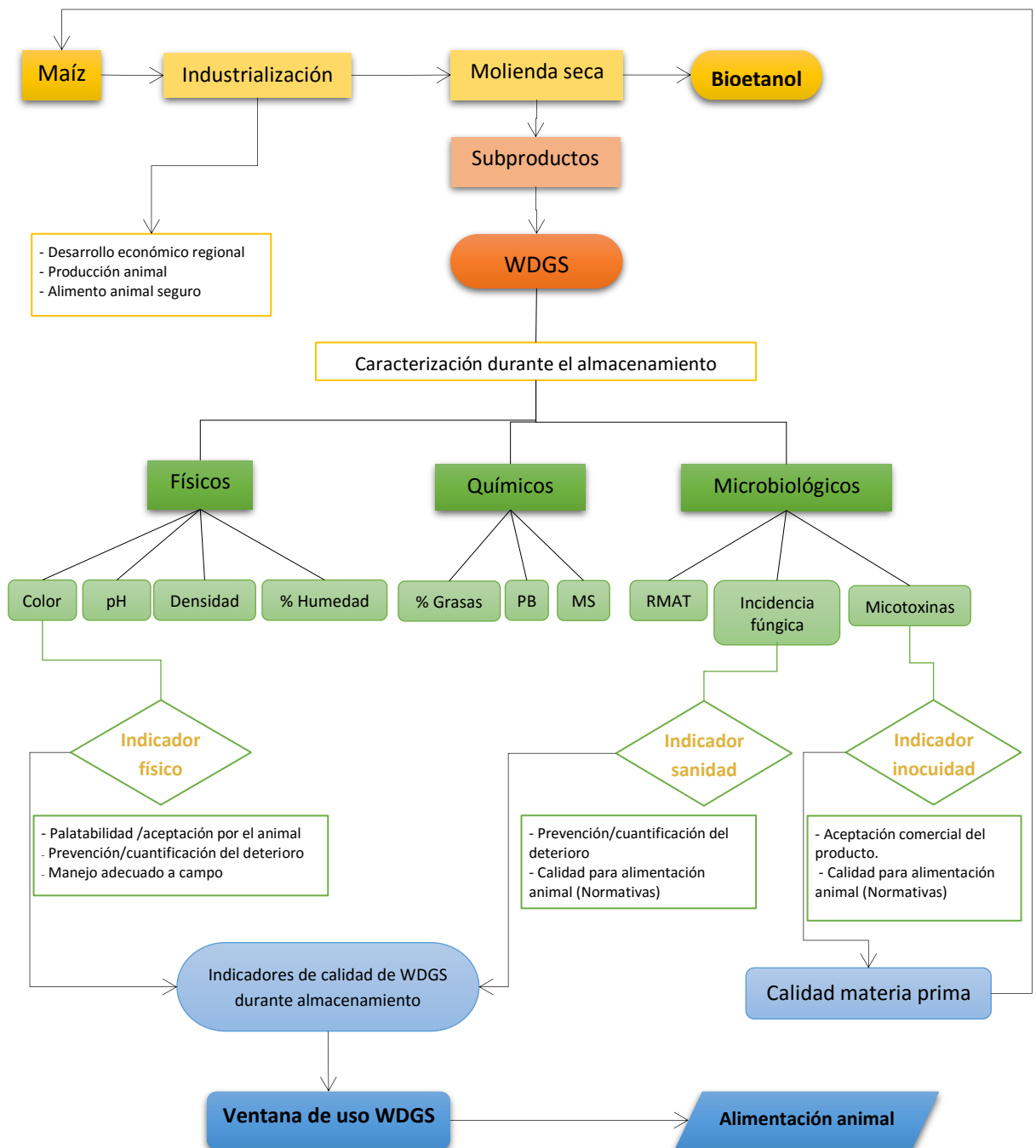
CONSIDERACIONES FINALES

La burlanda húmeda (WDGS), es el subproducto de la transformación de granos de maíz más importante en cuanto a volumen, el más económico a nivel de energía del proceso global y con mayor valor nutricional. Sin embargo, su incorporación como alimento destinado a los animales enfrenta los mayores desafíos, debido al rápido deterioro y la pérdida de calidad que experimenta la burlanda al ser almacenada (Christensen et al., 2010). La corta vida útil de la burlanda en los establecimientos ganaderos, el riesgo de contaminación y los efectos negativos sobre la salud animal y humana, conducen indefectiblemente a la necesidad de medir su calidad e identificar posibles tratamientos que contribuyan a su inocuidad.

Según lo propuesto por Nyendu (2011) los mecanismos de deterioro de burlanda, responden a un complejo sistema de interacciones de los microorganismos presentes y las condiciones ambientales. En base a los resultados de este trabajo de tesis, se puede afirmar que este proceso no es independiente de la calidad del grano de maíz que le dio origen.

Se presentan de manera integrada en este capítulo los resultados y conclusiones propuestas en apartados anteriores de este trabajo con la finalidad de poder dar respuesta al objetivo de identificar las variables de calidad durante el almacenamiento como herramientas para estimar la ventana de uso de burlanda como alimento animal (Figura 4.1).

Figura 4.1 Flujoograma integrador de la determinación de variables de calidad en burlanda húmeda de maíz



Entre las variables físicas se sugiere que las determinaciones de color y pH resultarían mediciones sencillas, en estrecha relación con posibles alteraciones de burlanda húmeda de maíz almacenada en condiciones de exposición al oxígeno.

Durante los 14 días de almacenamiento con distintos tratamientos, no se registraron modificaciones en cuanto a su composición nutricional en lo relativo a su contenido de proteínas, grasas y materia seca. Mientras que la determinación de incidencia fúngica, permitió evaluar la evolución de hongos micotoxicogénicos de riesgo potencial.

La presencia de micotoxinas al inicio del ensayo sugiere la necesidad de evaluarlas como criterio de aceptación comercial previo al ingreso al establecimiento ganadero.

Es importante destacar que el nivel de contaminación con hongos, pudo ser controlado durante el almacenamiento al aplicar *Lactobacillus* y Salpro. Estos productos disminuyeron además la presencia de microorganismos mesófilos totales y mantuvo baja la concentración de micotoxinas, asociado a un color amarillo claro brillante hasta el final del ensayo.

La implementación del registro en burlanda almacenada en el campo, de variables de calidad (color, pH, screening de incidencia fúngica) no requiere de una gran inversión económica ni de proceso y de esta manera se podrá fomentar el uso de WDGS a nivel regional como componente de la ración destinada a la alimentación animal y asegurar en cada eslabón de la cadena su calidad nutricional e inocuidad.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Ahern, N. A., Nuttelman, B. L., Klopfenstein, T. J., MacDonald, J. C., Erickson, G. E. & Watson, A. K. (2016). *Comparison of wet and dry distillers grains plus solubles to corn as an energy source in forage-based diets*. Journal the Professional Animal Scientist, 32(6), 758-767.

Alvarez, E., Cardozo, M., Depetris, G., Castellari, C., Cristos, D., Montiel, M. D. & Bartosik, R. (2019). *Storage of WDGS under hermetic and non-hermetic conditions: Effect on sensory properties, microorganisms, mycotoxins and nutritional value*. Journal of Stored Products Research, 80, 65-70.

Anderson, J. L., Schingoethe, D. J., Kalscheur, K. F. & Hippen, A. R. (2006). *Evaluation of dried and wet distillers grains included at two concentrations in the diets of lactating dairy cows*. Journal of Dairy Science, 8(89), 3133-3142.

ANMAT. (2014). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos indicadores*. ICMSF. ANMAT.

AOAC. (1986). Horwitz, W. *Official Methods of Analysis*. Washington DC. Association of Official Analytical Chemists 14th edition.

AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (Thirteenth Edition ed.). (W. Horwitz, Ed.) Washington DC. Association of Official Analytical Chemists.

Aristizabal Rivera, D. P. (2017). *Uso de coproductos de la industria del Etanol en la alimentación animal*. Zoociencia, 3(2), 4-14.

Arroquy, J., Berruhet, F., Martinez Ferrer, J., Pasinato, A. & Brunetti, M. (2014). *Uso de subproductos del destilado de granos en bovinos para carne*. Jornada Nacional de Forrajes Conservados. Sitio Argentino de Producción Animal. Manfredi, Córdoba.

Barkai-Golan, R. (2001). *Attack mechanisms of the pathogen. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. R. Barkai-Golan. Elsevier Science B.V. New York, USA. 1(5), 54-58.

Bragachini, M., Ustarroz, F., Bragachini, M. & Mathier, D. (2014). *Granos destilados solubles, un subproducto a tener en cuenta*. INTA E.E.A. Manfredi. Producir XXI, Bs. As., 22(268), 38-40.

- Brunetti, M. A., Frossasco, G. & Martinez Ferrer, J. (2015). *Composición química de los granos de destilería*. Repositorio Digital de Acceso Abierto del Sitio Argentino de Producción Animal.
- Bruni, M., Trujillo, A., Facchín, L., Saragó, L. & Chilibroste, P. (2014). *Evaluación nutricional para rumiantes de la burlanda de sorgo húmeda obtenida de la producción de etanol de ALUR Paysandú*. Cangue 35, 28-38.
- Bruno, O. A., Castro, H., Comerón, E. A., Díaz, M. C., Guaita, S., Gaggiotti, M. C. & Romero, L. A. (1995). *Técnicas de muestreo y parámetros de calidad de los recursos forrajeros*. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina. Publicación Técnica N° 56 ISSN 0485-9057.
- Butkeraitis, P., dos Santo, I. & Rodriguez, J. (2008). *El efecto de las micotoxinas en rumiantes*. Engormix. Süd Chemie México. http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/Micotoxicosis/100-efecto_micotoxinas.pdf
- CADER. (2012). *Evolución del mercado de biocombustibles en Argentina*. Cámara Argentina de Energía renovables. <https://www.cader.org.ar/>
- Calzada, J. & Ramseyer, F. (2018). *Se espera un record histórico en la producción de bioetanol en Argentina en el 2018*. Bolsa de Comercio de Rosario, 1875.
- Casini, C. (2015). *El riesgo de las Micotoxinas en granos de maíz destinados a alimento animal*. Engormix. <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/riesgo-micotoxinas-granos-maiz-t31979.htm>
- Christensen, D. L., Rolfe, K., Klopfenstein, T. J. & Erickson, G. E. (2010). *Evaluation of storage covers when wet distillers byproducts are mixed and stored with forages*. Nebraska Beef Report, 24- 28.
- Codex. (1995). *Norma General del Codex para los aditivos alimentarios*. Codex Alimentarius. Stan, 192-1995.
- Cromwell, G. L., Herkelman, K. L. & Stahly, T. S. (1993). *Physical, chemical, and nutritional characteristics of distillers dried grains with solubles for chicks and pigs*. Journal of Animal Science, 71(3), 679-686.
- De Blas, C., Mateos, G. G. & Rebollar, P. G. (2007). *DDGS de maíz (Granos de destilería, DDG, y solubles, DDS)*. Sitio Argentino de Producción Animal.
- De León, M., Echeverría, A. & Giménez, R. (2015). *Almacenaje y manejo de burlanda húmeda y seca*. INTA Argentina.
- De María, P., Mauris, V., Pose, H. & Sabbia, J. (2017). *Manual práctico micotoxinas en ganado lechero*. Sitio Argentino de Producción Animal.

- DeLange, A. J. (2008). *The standard reference method of beer color specification as the basis for a new method of beer color reporting*. Journal of de American Society of Brewing Chemistry, 143-150.
- Di Lorenzo, N. (2013). *Uso de subproductos de la producción de etanol en nutrición animal*. Sitio Argentino de Producción Animal. Jornada Nacional de Forrajes.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. (2011). *InfoStat versión – Software Estadístico*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Donkin, S. S. (2008). *Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle*. Revista Brasileira Zootecnia, 37, 280-286.
- Echeverría, A. (2016). *Análisis económico de la utilización de burlanda húmeda de maíz almacenada, en dietas de engorde a corral*. Tesis de especialización Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. England: Commonwealth Mycological Institute.
- Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Adams, D. C. & Rasby, R. J. (2005). *General overview of feeding corn milling co-products to beef cattle*. Department of Animal Science. Nebraska – Lincoln. Corn processing coproducts manual, 3 - 12.
- Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Rasby, R. J., Stalker, L. A. & Pluggeb. (2008). *Storage of wet corn co-products*. Digitalcommons University of Nebraska - Lincoln.
- FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Alimentación y nutrición, 25 ISBN 92-5-303013-5
- FAO. (2008). *The state of food and agriculture 2008*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105980-7
- FAO. (2014). *Buenas prácticas para la industria de piensos – Implementación del Código de Prácticas Sobre Buena Alimentación Animal*. Roma: Manual FAO de producción y sanidad animal.
- FAO. (diciembre de 2018). *Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Farlin, S. D. (1981). *Wet distillers grain for finishing cattle*. Amin. Nutr. Health, 36-35.
- FEDNA. (2012). *Granos y solubles de maíz (DDGS)*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

Fernández Palma, G. (2014). *Ciencia y tecnología para un desarrollo sostenible*. Maizar Argentina.

Firkins, J. L., Berger, L. L. & Fahey, G. C. (1985). *Evaluation of wet and dry distillers grains and wet and dry corn gluten feeds for ruminants*. J. Anim. Sci, 60 - 847.

Gallardo, M. (2005). *Ganadería de Precisión: Uso de subproductos de la agroindustria*. 5^{ta} Jornada Nacional de forrajes conservados. INTA E.E.A. Manfredi Argentina

Garcia, A. D. & Kalscheur, K. F. (2006). *Ensiling wet distillers grains with other feeds*. Extension Extra Open Public Research Access Institutional Repository and Information Exchange.

Garcia, A. & Kalscheur, K. (2007). *Storage of wet distillers grains*. Tri-State dairy Nutrition Conference, 111-118.

Garcia, A., Kalscheur, K., Hippen, A. & Schingoethe, D. (2008). *Mycotoxins in corn distillers grains a concern in ruminants?* Extension 135.

García-Winder, M., Riveros, H., Pavez, I., Rodríguez, D., Lam, F., Arias, J. & Herrera, D. (2009). *Cadenas agroalimentarias: un instrumento para fortalecer la institucionalidad del sector agrícola y rural*. COPAL: Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios.

Gil, M. G. & Casagrande, N. N. (2016). *Evaluación de la inclusión de granos de destilería de maíz (burlanda) húmedos y secos en dietas de recría y engorde de toritos Holando Argentino*. Trabajo Final de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional de Villa María Instituto A. P. Ciencias Básicas y Aplicadas.

Gimeno, A. (2004). *Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control*. Engormix. Süd Chemie México

Harding, J. L. (2012). *Spoilage of wet distillers grains plus solubles when stored in a bunker*. MS. Thesis. University of Nebraska-Lincoln.

Herrera, J. & Jordán, H. (2010). *Granos de destilería, una alternativa viable para la producción de leche vacuna. Características, composición y uso*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 44(2), 97-105.

Huertas, R. A. P. (2010). *Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, ISSN-e 1909-9959. 8(1), 93-105.

Kalscheur, K. F. (2005). *Impact of feeding distillers grains on milk fat, protein, and yield*. Distillers Grains Technology Council. 9th Annual Symposium.

- Kalscheur, K. F. & Garcia, A. D. (2005). *Storage, ensiling, and handling wet ethanol coproducts*. Journal of Animal Science, 83(2), 50.
- Kalscheur, K. F., Garcia, A. D., Hippen, A. R. & Schingoethe, D. J. (2011). *Fermentation characteristics of ensiling wet corn distillers grains in combination with corn silage*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1336 - 1340.
- Kalscheur, K., Garcia, A., Rosentrater, K. & Wright, C. (2008). *Co-productos del etanol para las dietas del ganado*. SDSU Extension Fact Sheets. Cooperative Extension Service, South Dakota State University.
- Kinman, L. A., Richards, C. R., Hicks, R. B., Dillwith, J. W., Hilton, G. G., Morgan, J. B. & VanOverbeke, D. L. (2011). *Influence of feeding various levels of wet and dry distillers grains to yearling steers on carcass characteristics, meat quality, fatty acid profile and retail case life of longissimus muscle*. Oklahoma Agricultural Experiment Station. Journal of Animal Science, 89(1), 179-84...
- Kleinschmit, D. H., Schingoethe, D. J., Kalscheur, K. F. & Hippen, A. R. (2006). *Evaluation of various sources of corn dried distillers grains plus solubles for lactating dairy cattle*. Journal of Dairy Science, 89(12), 4784-4794.
- Klopfenstein, T. J., Erickson, G. E. & Bremer, V. (2008). *Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry*. Journal of Animal Science, 86(5), 1223-1231.
- Klopfenstein, T. & Grant, R. (2003). *Uses of corn coproducts in beef and dairy rations*.
- Kononoff, P. J. & Janicek, B. (2005). *Understanding milling feed byproducts for dairy cattle*. Institute of Agriculture and Natural Resources at the University of Nebraska–Lincoln. NebGuide G1586.
- Kung, L. (2008). *Silage fermentation end products and microbial populations: their relationships to silage quality and animal productivity*. Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners.
- Kurtzman, C. P. (2006). *Detection, identification and enumeration methods for spoilage yeast*. Food Spoilage Microorganisms. C. Blackburn, 28-54.
- Lehman, R. M. & Rosentrater, K. A. (2007). *Microbial development in distillers wet grains produced during fuel ethanol production from corn (Zea mays)*. Canadian Journal of Microbiology, 53(9), 1046-1052.
- Liu, C., Schingoethe, D. J. & Stegeman, G. A. (2000). *Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows*. Journal Dairy Science, 83, 2075-2084.
- Liu, K. (2011). *Chemical composition of distillers grains, a review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(5), 1508-1526.

- López de Cereaim & Soriano, J. (2007). Ocratoxinas. En J. M. Soriano., *Micotoxinas en Alimentos*.
- Loy, D. & Strohbahn, D. (2007). *Long Term Storage of Wet Distillers Grains and CDS*. Ethanol feeds. Iowa State University.
- MAIZAR. (2012). *Estrategia para el desarrollo de la cadena del maíz y del sorgo*. Maizar Argentina.
- Maluenda García, J. (2016). *Máximos históricos para el bioetanol en 2015*. Agrodigital. Madrid.
- Mathur, S. B. & Kongsdal, O. (2003). *Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi*. ISTA.
- MINEM. (2017). *Estadísticas de biodiesel y bioetanol*. Ministerio de Energía y Minería.
- Mustafa, A., Qiao, S., Thacker, P., Mckinnon, J. & Christensen, D. (2000). *Nutritional value of an extruded spent hen– soybean meal blend for pigs and ruminants*. J. Sci. Food Agric., 80 (11): 1648-1654
- Nyendu, G. C. (2011). *Storability of modified wet distillers grains with solubles*. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University Digital Repository. 10229
- Orlando, C. A., Fernandez, M. C., Monserrat, S. V. & Sluka, E. (2014). *Efecto de la aplicación de virukill sobre granos de maíz con aflatoxinas*. Revista Agronómica del Noroeste Argentino, 34 (2): 15-16.
- Queiroz, O. & Calveyra, A. (2014). *La opción de la burlanda y resultados de su uso en un tambo de Ucacha*. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Ramirez-Ramirez, H. A., Geis, A. R., Heine, C. S., Clark, K. J., Gehman, A. M. & Kononoff, P. J. (2011). *Storage conditions of wet corn distillers' grains with solubles in combination with other feeds and understanding the effects on performance of lactating dairy cows*. Canadian Journal of Animal Science, 91(2), 331-339.
- Rivera Rivera, A. & Alba Maldonado, J. M. (2017). *Revisión: Nirs en el análisis de alimentos para la nutrición animal*. Revista Ingenio, 13(1), 199-211. <https://doi.org/10.22463/2011642X.2149>
- Robinson, P., Karges, K. & Gibson, M. (2008). *Nutritional evaluation of four co-product feedstuffs from the motor fuel ethanol distillations industry in the Midwestern USA*. Animal Feed Science and Technology, 146, 345-352.
- Romero, N. (1997). *Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos*. Producción y manejo de datos de

composicion química de alimentos en nutrición Chile. C. Moron, I. Zacarias, & S. d. Pablo, 165-170.

Rosentrater, K. A. & Lehman, R. M. (2008). Physical and chemical properties of corn distillers wet grains. *Applied engineering in agriculture*, 24(1), 57-62.

Sarturi, J. O. (2013). *Challenges in the utilization of high moisture co-products in diets for ruminants*. III International Symposium on Forage Quality and Conservation. Campinas, SP – Brazil.

Schingoethe, D., Kalscheur, K., Hippen, A. & García, A. (2009). *The use of distillers products in dairy cattle diets*. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5802-5813.

Schoonmaker, J. P., Trenkle, A. H. & Beitz, D. C. (2010). *Effect of feeding wet distillers grains on performance, marbling deposition, and fatty acid content of beef from steers fed low-or high-forage diets*. *Journal of Animal Science*, 88(11), 3657-3665.

Shurson, J., & Noll, S. (2005). *Feed and alternative uses for DDGS*. Department of Animal Science. University of Minnesota. No. 804-2016-52518.

Siebold, E., Dumont, J., Navarro, H. & Santana, R. (2003). *Uso de ácido fórmico más formiato de amonio en ensilajes de praderas permanentes en el sur de Chile*. *Agricultura Técnica*, 63(3), 251-258.

Siverson, A., Titgemeyer, E., Montgomery, S., Oleen, B., Preedy, G. & Blasi, D. (2014). *Effects of corn processing and dietary wet corn gluten feed inclusion on performance and digestion of newly received growing cattle*. *Journal of Animal Science*, 92(4) 1604–1612.

Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.

Spiehs, M. J., Whitney, G. C. & Shurson, G. C. (2002). *Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota*. *Journal Animal Science*, 80, 2639-2645.

Stein, H. & Shurson, G. (2009). *The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets*. *Journal of Animal Science* 87(4), 1292–1303.

Stock, R. A., Lewis, J. M., Klopfenstein, T. J. & Milton, C. T. (2000). *Review of new information on the use of wet and dry milling feed by-products in feedlot diets*. American Society of Animal Science.

Tjardes, K. & Wright, C. (2002). *Feeding corn distiller's co-products to beef cattle*. College of Agriculture & Biological Sciences / South Dakota State University . USDA.

Vergagni, G. (2004). *La industria del metanol a partir del maíz*. Maizar Argentina. [http://www.maizar.org.ar/documentos/etanol%20i\[1\].factibilidad%20verpublica.pdf](http://www.maizar.org.ar/documentos/etanol%20i[1].factibilidad%20verpublica.pdf)

Viera Freitas, M. & Cardozo Orellano, G. (2016). *Efecto de un inoculante microbiano sobre parámetros químicos y microbiológicos en silos experimentales de granos húmedos de sorgo*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias Orientación: Tecnología Facultad de Veterinaria Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Walker, P. M. & Foster, L. A. (2008). *The evaluation of a vacuum storage method for high moisture distillers grain and its effect as a protein and energy supplement for beef cows*. *The Professional Animal Scientist*, 24(6), 648-655.

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N. & Faruq, G. (2017). *Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.

Zain, M. E. (2011). *Impact of mycotoxins on humans and animals*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.

Zinedine, A. & Soriano, J. M. (2007). Zearalenona. En J. M. Soriano, *Micotoxinas en alimentos* España: Editorial Díaz de Santo, 1, 255-268.