

ProGas v1.1: Program for the preprocessing and data analysis of *in vitro* gas production of ruminant foods. Technical note

ProGas v1.1: Programa para el preprocesamiento y análisis de datos de producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes. Nota técnica

Yaneilys García Avila, Mildrey Torres Martínez and R. Rodríguez Hernández

Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central km 47 ½, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: feygarciaa@ica.co.cu

Yaneilys García Avila: <https://orcid.org/0000-0003-0126-6233>

Mildrey Torres Martínez: <https://orcid.org/0000-0001-7942-0195>

R. Rodríguez Hernández: <https://orcid.org/0000-0003-1894-4328>

ProGas v1.1 was developed to support researchers in the preprocessing and data analysis of *in vitro* gas production of ruminant foods. For the implementation of this program, Microsoft Office Excel 2007 was used. The conversion of data to volume ($\text{mL g}^{-1} \text{incOM}$) was carried out with an established equation. The duration of the gas production phases was estimated by means of the average variation rates and the critical points. A total of six sheets were designed in the program: general, enter pressures, accumulated volume, critical points, graphs and help. It is concluded that the proposed program allowed preparing the experimental data for its subsequent modeling. In addition, the methodology that was applied to estimate the critical points did not require a mathematical model to calculate the duration of the *in vitro* gas production phases, which facilitated the description of the degradation kinetics of the evaluated foods.

Key words: *processing, speed, critical points, phases, fermentation*

There are several techniques to study the nutritional value of foods in the rumen. To fulfill the hypotheses of the experimental design, *in vivo* techniques need sufficient numbers of animals and, therefore, large volumes of plant material (Rodríguez *et al.* 2020). However, *in vitro* techniques are less time consuming, require less food as substrate and allow greater control of experimental conditions (Arce *et al.* 2020). In this regard, Theodorou *et al.* (1994) proposed a method to study the fermentation kinetics of substrates from the *in vitro* gas production (IVGP) generated by their fermentation, which is measured in bottles of constant volume and at different times.

There are some programs that specialize in modeling ruminal degradation kinetics. These need a mathematical function to estimate the parameters that describe the IVGP kinetics. This is the case of the NEWAY EXCEL program, version 5.0 (Chen 1997) and the ROMENAL procedure (Correa 2004). Both use the Excel platform and are commonly applied in *in situ* experiments. One of their disadvantages is that they have a reduced number of mathematical models to describe the IVGP kinetics.

Regardless of the used program, the most common parameters during modeling are: asymptotic IVGP, IVGP

ProGas v1.1 se desarrolló para apoyar a los investigadores en el preprocesamiento y análisis de datos de la producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes. Para la implementación de este programa se utilizó Microsoft Office Excel 2007. La conversión de los datos a volumen ($\text{mL g}^{-1} \text{MOinc}$) se realizó con una ecuación establecida. La duración de las fases de producción de gas se estimó mediante las tasas de variación medias y los puntos críticos. Se diseñaron seis hojas en el programa: general, entrar presiones, volumen acumulado, puntos críticos, gráficas y ayuda. Se concluye que el programa propuesto permitió preparar los datos experimentales para su posterior modelación. Además, la metodología que se aplicó para estimar los puntos críticos no necesitó un modelo matemático para calcular la duración de las fases de la producción de gas *in vitro*, lo que facilitó la descripción de la cinética de degradación de los alimentos evaluados.

Palabras clave. *Procesamiento, velocidad, puntos críticos, fases, fermentación*

Existen diversas técnicas para estudiar el valor nutritivo de los alimentos en el rumen. Para cumplir las hipótesis del diseño experimental, las técnicas *in vivo* necesitan cantidades de animales suficientes y, por tanto, elevados volúmenes de material vegetal (Rodríguez *et al.* 2020). Sin embargo, las técnicas *in vitro* consumen menos tiempo, requieren menos cantidad de alimento como sustrato y permiten mayor control de las condiciones experimentales (Arce *et al.* 2020). Al respecto, Theodorou *et al.* (1994) propusieron un método para estudiar la cinética de fermentación de los sustratos a partir de la producción de gas *in vitro* (PGIV) generada por su fermentación, la cual se mide en botellas de volumen constante y en diferentes horarios.

Existen algunos programas que se especializan en la modelación de la cinética de degradación ruminal. Estos necesitan una función matemática para estimar los parámetros que describen la cinética de PGIV. Este es el caso del programa NEWAY EXCEL, versión 5.0 (Chen 1997) y del procedimiento RUMENAL (Correa 2004). Ambos utilizan la plataforma Excel y se aplican de forma común en experimentos *in situ*. Una de las desventajas que presentan es que cuentan con un número reducido de modelos matemáticos para describir la cinética de la PGIV.

Independiente del programa que se utilice, los

rate, Lag phase and inflection point, among others. In relation to the inflection point, it is known that it allows identifying the moment in which the food reached the maximum degradation rate. However, the mathematical models that are most used to describe the IVGP kinetics, having a single inflection point, do not allow knowing the time in which the food stopped degradation. If it is added to this the low availability of computer programs related to IVPG, it is necessary to implement a program specialized in the preprocessing and data analysis of IVGP ruminant foods.

The Microsoft Office Excel 2007 development environment was used, which has a friendly platform, common among researchers, with numerous options, formulas and logical operators that make the implementation process easy. The conversion of the IVGP values in Pascal (Pa) to volume data in mL g⁻¹ incOM was carried out using the equation proposed by Rodríguez *et al.* (2013):

$$\text{Volume (mL g}^{-1} \text{ incOM)} = (\text{Pressure (Pa} \cdot 103) + 4.95) / (\text{incOM})$$

where: incOM is the incubated organic matter.

The estimation of the speed and acceleration of the IVGP was based on the calculation of the mean variation rates (figure 1) of the i-th observations. This is the slope of the secant line to the function that passes through the abscissa points t_i and t_i+h_i . Particularly, in the IVGP experiments, the h value corresponds to the difference between the consecutive sampling times. It is important to highlight that, when the measurements are not taken evenly spaced and the time between IVGP samples is lengthened, h increases and the approximations are less exacts. However, with these concepts it is possible to have an approximate image of the real speed of IVGP, especially when h is small. Similarly, acceleration can be calculated by performing the same procedure at the approximate IVGP point velocities.

parámetros más comunes durante la modelación son: PGIV asintótica, tasa de PGIV, fase Lag y punto de inflexión, entre otros. En relación con el punto de inflexión, se conoce que permite identificar el momento en que el alimento alcanzó la velocidad máxima de degradación. Sin embargo, los modelos matemáticos que más se usan para describir la cinética de PGIV, al tener un solo punto de inflexión, no permiten conocer el tiempo en el que el alimento cesó la degradación. Si a esto se le suma la baja disponibilidad de programas informáticos relacionados con el tema de PGIV, es necesario implementar un programa especializado en el preprocesamiento y análisis de datos de PGIV de alimentos para rumiantes.

Se utilizó el entorno de desarrollo Microsoft Office Excel 2007, que tiene una plataforma amigable, común entre los investigadores, con numerosas opciones, fórmulas y operadores lógicos que hacen fácil el proceso de implementación. La conversión de los valores de PGIV en Pascal (Pa) a datos de volumen en mL g⁻¹ MOinc se realizó mediante la ecuación propuesta por Rodríguez *et al.* (2013):

$$\text{Volumen (mL g}^{-1} \text{ MOinc)} = (\text{Presión (Pa} \cdot 103) + 4.95) / (\text{MOinc})$$

donde: MOinc es la Materia orgánica incubada.

La estimación de la velocidad y aceleración de la PGIV se basó en el cálculo de las tasas de variación media (figura 1) de las i-ésimas observaciones. Esto no es más que la pendiente de la recta secante a la función que pasa por los puntos de las abscisas t_i y t_i+h_i . Particularmente, en los experimentos de PGIV, el valor de h se corresponde con la diferencia entre los tiempos consecutivos del muestreo. Es importante señalar que, cuando las mediciones no se toman de forma equiespaciada y se alarga el tiempo entre los muestreos de la PGIV, la h aumenta y las aproximaciones son menos exactas. No obstante, con estos conceptos se puede tener una imagen aproximada de la velocidad real de PGIV, especialmente cuando h es pequeña. De igual manera, se puede calcular la aceleración, al realizar el mismo procedimiento a las

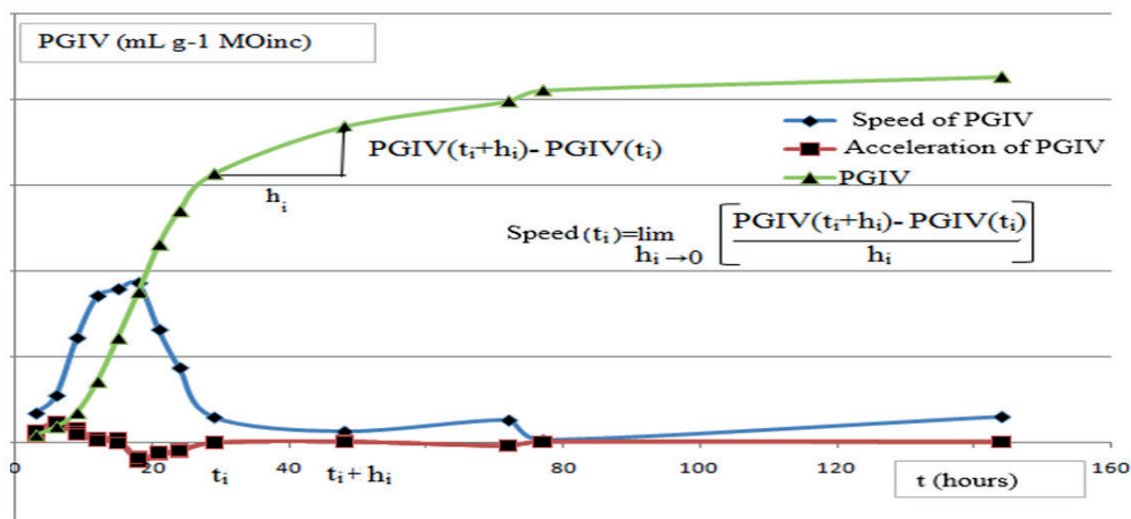


Figure 1. Performance of the IVGP of ruminant foods: speed and acceleration calculated by means of the average variation rates

To determine the time in which the maximum and minimum speed of IVGP occurred, the procedures for calculating the critical and inflection points were used, as reported by Pico and Alava (2018) and Jones (2019), who state that there is a local maximum of the function f at point a , if: $f'(a) = 0$ and $f''(a) < 0$ and there is a local minimum at point a , if: $f'(a) = 0$ and $f''(a) > 0$. On the other hand, if f' is derivable at point a and $f''(a) = 0$, there is an inflection point at a .

To locate the critical points in the IVGP speed curve, estimated from the experimental data, the time intervals between t_i and $t_i + h_i$ were analyzed. When the estimated acceleration at t_i was higher than zero, and the estimated acceleration at $t_i + h_i$ was lower than zero, the velocity was assumed to have a local maximum in the interval between t_i and $t_i + h_i$. On the other hand, when the estimated acceleration at t_i was lower than zero and the estimated acceleration at $t_i + h_i$ was higher than zero, it was estimated that the velocity had a local minimum in the interval between t_i and $t_i + h_i$. As shown in figure 1, the velocity was maximum when the acceleration intercepted the abscissa axis, and when the acceleration slope was negative. At this time, there was also an inflection point for the IVGP. This methodology, although it constitutes an approximation, can be applied to other types of experimental observations, and does not require a mathematical model to determine the critical and inflection points of the data set.

To access ProGas v1.1, users must have a computer running Microsoft Windows XP or newer versions of the operating system. In addition, they must have the Microsoft Office 2007 work package or higher versions. Then, they must copy and open the ProGas v1.1 file, in Excel format (.xls). When starting the program, the general sheet appears, from which you can see the names of the rest: enter pressures, accumulated volume, critical points, graphs and help. The only ones that can be edited are the general one and the one for enter pressures. Sheets must be used sequentially.

The general sheet is where the user enters the characteristics of the experiment. That is: name of the experiment, number of treatments that comprise it, number of repetitions, replications and times. In addition, the names of each treatment must be entered, with their respective fresh (g) and incubated (mL) matter.

The functionality (enter pressures) allows the researcher to fill in the pressure values measured with the manometer in Pa at the different sampling times. In addition, the user must fill in the gas production of the controls, and enter the hours in which each measurement was made (figure 2a). Once all these values are filled in, the application calculates the accumulated gas production and applies the conversion equation proposed by Rodríguez *et al.* (2013). For this, ProGas

velocidades puntuales aproximadas de la PGIV.

Para determinar el tiempo en el que ocurrió la velocidad máxima y mínima de PGIV, se utilizaron los procedimientos del cálculo de los puntos críticos y de inflexión, según refieren Pico y Alava (2018) y Jones (2019), quienes plantean que existe un máximo local de la función f en el punto a , si: $f'(a) = 0$ y $f''(a) < 0$ y existe un mínimo local en el punto a , si: $f'(a) = 0$ y $f''(a) > 0$. Por otra parte, si f' es derivable en el punto a y $f''(a) = 0$, existe un punto de inflexión en a .

Para localizar los puntos críticos en la curva de velocidad de PGIV, estimada a partir de los datos experimentales, se analizaron los intervalos de tiempo comprendidos entre t_i y $t_i + h_i$. Cuando la aceleración estimada en t_i fue mayor que cero, y la aceleración estimada en $t_i + h_i$ fue menor que cero, se supuso que la velocidad tuvo un máximo local en el intervalo entre t_i y $t_i + h_i$. Por su parte, cuando la aceleración estimada en t_i fue menor que cero y la aceleración estimada en $t_i + h_i$ fue mayor que cero, se estimó que la velocidad tuvo un mínimo local en el intervalo entre t_i y $t_i + h_i$. Como se muestra en la figura 1, la velocidad fue máxima cuando la aceleración interceptó con el eje de las abscisas, y cuando la pendiente de la aceleración fue negativa. En este horario, se produjo también un punto de inflexión de la PGIV. Esta metodología, aunque constituye una aproximación, se puede aplicar a otro tipo de observaciones experimentales, y no necesita un modelo matemático para determinar los puntos críticos y de inflexión del conjunto de datos.

Para acceder a ProGas v1.1, los usuarios deben contar con un ordenador que tenga un sistema operativo Microsoft Windows XP o versiones más actuales. Además, deben disponer del paquete de trabajo Microsoft Office 2007 o versiones superiores. Luego, deben copiar y abrir el archivo ProGas v1.1, en formato Excel (.xls). Al iniciar el programa aparece la hoja general, desde la cual se pueden ver los nombres de las restantes: entrar presiones, volumen acumulado, puntos críticos, gráficas y ayuda. Las únicas que se pueden editar son la general y la de entrar presiones. Las hojas se deben utilizar de forma secuencial.

En la hoja general es donde el usuario introduce las características del experimento. Esto es: nombre del experimento, cantidad de tratamientos que lo conforman, número de repeticiones, réplicas y horarios. Además, se deben introducir los nombres de cada tratamiento, con su respectiva materia fresca (g) e incubada (mL).

La funcionalidad (entrar presiones) permite al investigador llenar los valores de presión medidos con el manómetro en Pa en los diferentes horarios de muestreo. Además, el usuario debe llenar la producción de gas de los blancos, y poner las horas en que realizó cada medición (figura 2a). Una vez que llena todos estos valores, la aplicación calcula la producción acumulada de gas y aplica la ecuación de conversión propuesta por Rodríguez *et al.* (2013). ProGas v1.1 tiene en cuenta

v1.1 takes into account the IVGP of the corresponding controls. The result is shown in the accumulated table of gas production in mL g⁻¹ incOM, belonging to the accumulated volume sheet (figure 2b). This sheet also shows another table with the average value of IVGP (mL g⁻¹ incOM).

para ello, la PGIV de los blancos correspondientes. El resultado se muestra en la tabla acumulado de la producción de gas en mL g⁻¹ MOinc, perteneciente a la hoja volumen acumulado (figura 2b). En esta hoja también se muestra otra tabla con el valor promedio de PGIV (mL g⁻¹ MOinc).

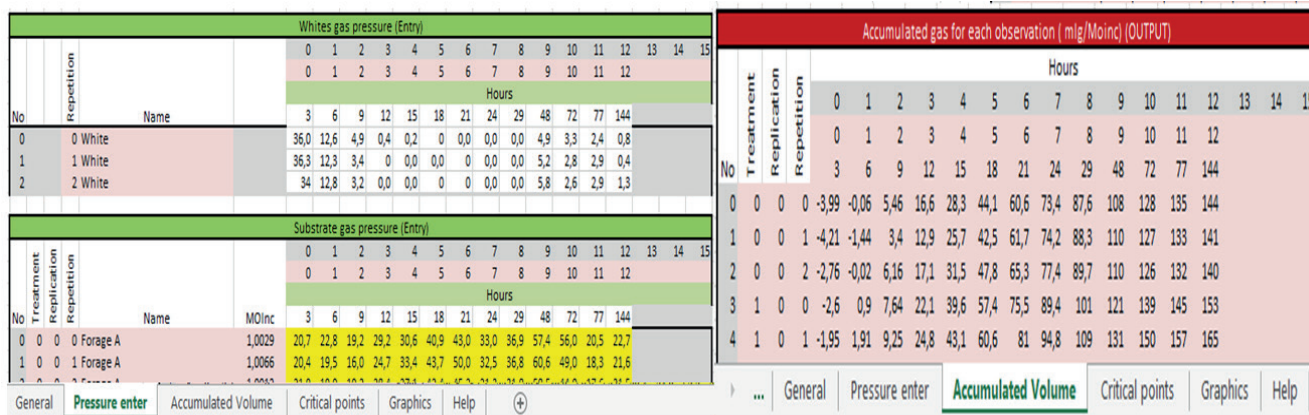


Figure 2. a) Sheet to enter pressures of the ProGas v1.1 program. b) Sheet of accumulative volume of ProGas v1.1 program. Outlet table

The critical points sheet is the special functionality of ProGas v1.1, since it allows a better understanding of the IVGP performance over time (figure 3a). Here the average rates of change are calculated as approximate indicators of those derived from the IVGP. The time at which the critical points were reached is shown, and it is specified if it is a local maximum or minimum. In addition, it provides the two critical points that were most repeated in each treatment. Having an approximation of the time in which the minimum speed of IVGP occurred allows knowing when the food finished the degradation. This can contribute to not extending the sampling time in the experiments, since these estimates are made with the experimental data, and without the need to fit a mathematical model. In addition, they allow better characterization of the food, by providing the duration of each IVGP phase.

La hoja puntos críticos es la funcionalidad especial de ProGas v1.1, pues permite conocer mejor el comportamiento de la PGIV en el tiempo (figura 3a). Aquí se calculan las tasas medias de variación como indicadores aproximados de las derivadas de la PGIV. Se muestra el tiempo en que se alcanzaron los puntos críticos, y se especifica si es un máximo o mínimo local. Además, brinda los dos puntos críticos que más se repitieron en cada tratamiento. Tener una aproximación del tiempo en que ocurrió la velocidad mínima de PGIV permite conocer cuándo el alimento terminó la degradación. Esto puede contribuir a no extender el tiempo de muestreo en los experimentos, ya que estas estimaciones se realizan con los datos experimentales, y sin necesidad de ajustar un modelo matemático. Además, permiten caracterizar mejor el alimento, al brindar la duración de cada fase de PGIV.

The graphic sheet shows the performance of the average accumulated volumes (mL g⁻¹ incOM) of each treatment (figure 3b). Lastly, the help sheet offers an explanation of the application's functionalities to

La hoja gráficos muestra el comportamiento de los volúmenes promedios acumulados (mL g⁻¹ MOinc) de cada tratamiento (figura 3b). Por último, la hoja ayuda ofrece una explicación acerca de las funcionalidades de la aplicación para facilitar el trabajo con el programa

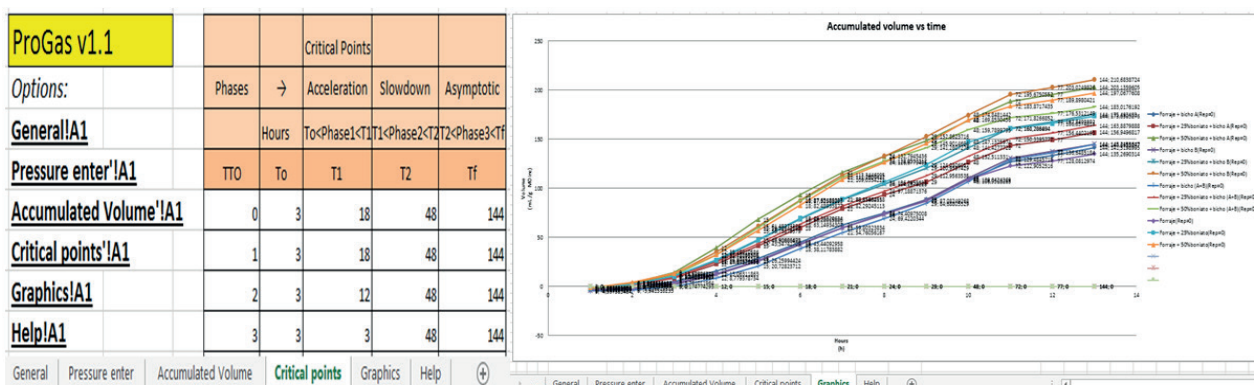


Figure 3. a) Critical points sheet of the ProGas v1.1 program. Outlet table example b) Graphic sheet of the ProGas v1.1 program. Outlet table example

facilitate working with the ProGas v1.1 program.

The proposed program made it possible to prepare the experimental data for subsequent modeling, especially when they were obtained using the IVGP technique, described by Theodorou *et al.* (1994). In addition, the methodology that was applied to estimate the critical points did not require a mathematical model to calculate the duration of the IVgp phases, which facilitated the description of the degradation kinetics of the evaluated foods.

Conflict of interest: There is no conflict of interest between the authors.

Authors contribution:

Yaneilys García Avila: Conceptualization, Investigation, Data curation, Formal analysis and Writing-original draft.

Mildrey Torres Martínez: Formal analysis and Writing-original draft

R. Rodríguez Hernández: Data curation, Formal analysis and Writing-original draft.

ProGas v1.1.

El programa propuesto permitió preparar los datos experimentales para su posterior modelación, especialmente cuando se obtuvieron mediante la técnica de PGIV, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Además, la metodología que se aplicó para estimar los puntos críticos no necesitó un modelo matemático para calcular la duración de las fases de la PGIV, lo que facilitó la descripción de la cinética de degradación de los alimentos evaluados.

Conflicto de intereses: No existe conflicto de intereses entre los autores.

Contribución de los autores:

Yaneilys García Ávila: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Análisis formal y Redacción-borrador original.

Mildrey Torres Martínez: Análisis formal y Redacción-borrador original.

R. Rodríguez Hernández: Curación de datos, Análisis formal y Redacción-borrador original.

References

- Arce, W., Rojas, A. & Campos, C.M. 2020. "Determinación del contenido energético de materiales forrajeros a través de la relación entre la técnica de producción de gas *in vitro* y la ecuación mecanicista del NRC (2001)". *Nutrición Animal Tropical*, 14(1): 13-35, ISSN: 2115-3527.
- Chen, B. 1997. NEWAY EXCEL Version 5.0. A utility for processing data of feed degradability and *in vitro* gas production. Rowett Research Institute. Aberdeen. Scotland. 29 pp.
- Correa, H.J. 2004. "RUMENAL: procedimiento para estimar los parámetros de cinética ruminal mediante la función Solver de Microsoft Excel®". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(3): 250-254, ISSN: 0120-0690.
- Jones, S.R. 2019. "Students' Application of Concavity and Inflection Points to Real-World Contexts". *International Journal of Science and Mathematics Education*, 17: 523–544, ISSN: 1571-0068. <https://doi.org/10.1007/s10763-017-9876-5>.
- Pico, U.C.D. & Alava, L.A.R. 2018. "Asistencia de softwares matemáticos en el estudio de cálculo diferencial en estudiantes de ingeniería". *Revista Bases de la Ciencia*, 3(2): 61-76, ISSN: 2588-0764.
- Rodríguez, R., Lores, J., Gutiérrez, D., Ramírez, A., Gómez, S., Elías, A., Aldana, A.I., Moreira, O., Sarduy, L. & Jay, O. 2013. "Inclusion of the microbial additive Vitafert in the *in vitro* ruminal fermentation of a goat diet". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(2): 171-178, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Ontivero, Y., García, Y., Sosa, D. & Gómez, S. 2020. "Empleo del tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas* L.) y la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivos a ensilajes mixtos para rumiantes". *Livestock Research for Rural Development*, 32(117), ISSN: 0121-3784. Available: <http://www.lrrd.org/lrrd32/7/rodri32117.html>.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. & France, J. 1994. "A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds". *Animal Feed Science and Technology*, 48: 185-197, ISSN: 0377-8401. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).

Received: December 2, 2021

Accepted: March 15, 2022