

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Influencia de la complementación con caña de azúcar y/o pulpa de cítrico en la fermentación *in vitro* de dietas basadas en *Megathyrus maximus* y *Leucaena leucocephala*

Influence of the complementation with sugarcane and/or citrus fruit pulp on the in vitro fermentation of diets based on Megathyrus maximus and Leucaena leucocephala

Onel López-Vigao^{1*}, Yuseika Olivera-Castro¹, Luis Lamela-López¹, Tania Sánchez-Santana¹, Iván Lenin Montejo-Sierra¹, Manuel González-Ronquillo² y Rolando Rojo-Rubio³

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Universidad de Matanzas, Ministerio de Educación Superior Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México

³Centro Universitario UAEM-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, México

*Correo electrónico: olopez@ihatuey.cu

RESUMEN: Se realizó un estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la sustitución de caña de azúcar por pulpa de cítrico (PC) sobre la cinética de producción de gas (PG) *in vitro* y la utilización de la energía de dietas basadas en *M. maximus* y *L. leucocephala*. Para ello, se usó un diseño completamente aleatorizado con tres niveles: 0 (control), 50 % (PC10) y 100 % (PC20) y tres repeticiones. Las dietas se incubaron *in vitro* (96 h) con inóculo ruminal de vacas. Se midió la PG a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h de incubación. Se estimaron parámetros de la fermentación ruminal tales como: la digestibilidad de la materia orgánica (DMO₂₄), la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS₉₆), la energía metabolizable (EM) y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La sustitución de caña de azúcar por PC incrementó linealmente ($p < 0,001$) la PG acumulada a las 24, 48 y 96 h de la incubación, así como la producción asintótica de gas (b), la tasa fraccional de producción de gas (c), la DMO₂₄, la EM y los AGCC. También, aumentó linealmente ($p < 0,01$) la DIVMS₉₆; mientras que la fase lag (L) disminuyó linealmente ($p < 0,001$). Las dietas PC10 y PC20 manifestaron un comportamiento similar en la mayoría de los parámetros, excepto en la DMO₂₄ y la producción de AGCC. Los resultados sugieren que la sustitución, tanto parcial como total, de caña de azúcar por PC tiene un impacto positivo en la producción de gas y en los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro*.

Palabras clave: degradabilidad ruminal, digestibilidad, valor energético

ABSTRACT: A study was conducted in order to evaluate the effect of the substitution of sugarcane by citrus fruit pulp (CFP) on the *in vitro* gas production kinetics and the energy utilization of diets based on *M. maximus* and *L. leucocephala*. For such purpose, a completely randomized design was used with three levels: 0 (control), 50 % (CFP10) and 100 % (CFP20) and three repetitions. The diets were incubated *in vitro* (96 h) with rumen inoculant from cows. The GP was measured at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h of incubation. Parameters of ruminal fermentation were estimated such as: organic matter digestibility (OMD₂₄), *in vitro* dry matter degradability (IVDMD₉₆), metabolizable energy (ME) and short-chain fatty acids (SCFAs). The substitution of sugarcane by CFP linearly increased ($p < 0,001$) the GP accumulated at 24, 48 and 96 h of incubation, as well as the asymptotic gas production (b), fractional gas production rate (c), OMD₂₄, ME and SCFAs. It also increased linearly ($p < 0,01$) the IVDMD₉₆; while the lag phase (L) linearly decreased ($p < 0,001$). The diets CFP10 and CFP20 showed a similar performance in most parameters, except in OMD₂₄ and production of SCFAs. The results suggest that the partial as well as total substitution of sugarcane by CFP has a positive impact on the gas production and on the parameters of *in vitro* ruminal fermentation.

Keywords: ruminal degradability, digestibility, energy value

INTRODUCCIÓN

En los sistemas silvopastoriles (SSP), debido al incremento en la calidad del pasto en asociación con la leguminosa y al aporte de follaje que hace esta última a la ración, se ha evidenciado un exceso de proteína bruta (PB) en la dieta de las vacas; mientras que la energía resulta deficitaria (López, 2003). Por ello, es importante usar complementos como la caña de azúcar que mejoren el balance de energía de la dieta en pastoreo.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cultivo que se produce en más de 100 países del mundo, posee un alto rendimiento de materia seca por hectárea que excede el de cualquier otro forraje usado para la alimentación animal (Abdel-Aziz *et al.*, 2015); además, se cosecha fundamentalmente en el período poco lluvioso (Rodríguez *et al.*, 2013), que coincide con la disminución del rendimiento de los pastos (Fundora *et al.*, 2013), por lo cual representa una fuente de alimento importante para los rumiantes en el trópico (Menezes *et al.*, 2011; Álvarez, 2012). Sin embargo, presenta insuficiencias nutricionales, como el bajo contenido de proteína y minerales, la lenta degradación de la fibra y el prolongado tiempo de retención de la FDN de la pared celular en el rumen (Martín, 2004).

Por otra parte, los subproductos alimentarios, que tienen bajo valor económico como alimentos para el consumo humano, se han convertido actualmente en una de las principales fuentes de nutrientes y energía para apoyar la producción de leche (Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008).

En el mundo se obtiene una gran cantidad de subproductos de la industria cítrica (Bampidis y Robinson, 2006), al igual que en América (IBGE, 2011) y en Cuba (Fernández, 2008); los cuales se usan principalmente en la dieta de los rumiantes, ya sea en forma fresca (Arthington y Pate, 2001), o conservados mediante deshidratación (Volanis *et al.*, 2006) y/o ensilaje (Lashkari *et al.*, 2014).

El uso de los subproductos agroindustriales para la alimentación de los rumiantes contribuye de forma sana, tanto en el ámbito económico como en el ambiental, a reducir el vertimiento de basura en los ecosistemas y disminuir los costos en el manejo de residuales (Salvador *et al.*, 2014).

La pulpa de cítrico (PC) representa el 60 % del peso fresco del fruto, con 19,7 % de MS como promedio (Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008); 6,6 % de PB y digestibilidad de la MS de 62,9 % (Bampidis y Robinson, 2006). Asimismo, la PC constituye un adecuado suplemento energético para

vacas lecheras en lactación (Bampidis y Robinson, 2006); tiene alto potencial de degradabilidad ruminal y elevada digestibilidad aparente, y se considera un alimento rico en pectinas (Lashkari y Taghizadeh, 2013). De ahí que se catalogue como un concentrado fibroso (Bampidis y Robinson, 2006), que puede incluso remplazar parcialmente los granos de cereales en las raciones de los animales, sin efectos adversos en la producción y la calidad de la leche (Salvador *et al.*, 2014).

Además, la PC modifica la fermentación ruminal, mejora la digestión de la fibra (Gado *et al.*, 2011), e incrementa la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras (Gado *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la técnica de producción de gas *in vitro* tiene potencial para investigar el efecto asociativo entre distintos alimentos (Bakhashwain *et al.*, 2009); por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sustitución de caña de azúcar por PC sobre la cinética de producción de gas *in vitro* y la utilización de la energía de dietas basadas en *Megathyrus maximus* y *Leucaena leucocephala*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área para la colecta de las muestras. Las muestras se tomaron en los meses de enero y febrero del área de pastoreo de la vaquería 66, perteneciente a la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas –Cuba–, la cual se ubica geográficamente en los 22° 58' 39" de latitud norte y los 81° 29' 55,66" de longitud oeste, a 100 msnm (Academia de Ciencias de Cuba, 1989). El suelo es Pardo con carbonatos (Hernández *et al.*, 2015). El clima es cálido tropical (Centro del Clima, 2013), con una temperatura y precipitación promedio anual de 24,4 °C y 1 300 mm, respectivamente.

Método para la colecta de las muestras. Para la colecta de las muestras de pastos (~ 4 kg), se simuló la selección que realizan los animales al pastar. En las áreas se recolectaron manualmente las hojas y los tallos tiernos comestibles (~ 3 kg), simulando el ramoneo que hacen los animales, en 10 de los árboles establecidos en el cuartón hasta una altura de 2 m, según la metodología propuesta por Herrera (2006).

Las muestras de pulpa de cítrico y caña de azúcar troceada se tomaron de forma homogénea del comedero de los animales, posteriormente a la oferta, en el horario de la mañana.

Preparación de las muestras. Después de la colecta, las muestras se transportaron al laboratorio de análisis químico de la Estación Experimental de

Pastos y Forrajes Indio Hatuey; y se secaron en estufa de ventilación forzada a temperatura de 65 °C, durante 72 h, para estimar el contenido de MS. Posteriormente, se molieron en un molino estacionario de cuchillas —con criba de 1 mm de diámetro en sus orificios—, se envasaron 50 (\pm 1) g de muestra en bolsas de nailon, y finalmente estas se sellaron.

Procedimientos analíticos. El contenido de MS residual del alimento se determinó mediante el secado en estufa a 60 °C durante 48 h, y la MO después de la incineración en horno-mufla a 550 °C durante 4 h. La proteína bruta (PB, N x 6,25) se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). El contenido de fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina (Lig) se analizó de acuerdo con el procedimiento de Van Soest *et al.* (1991), sin corrección por cenizas, usando bolsas de filtro ANKOM F-57 en un analizador de fibras ANKOM²⁰⁰ (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, USA). En la tabla 1 aparece la composición química de los alimentos usados en las dietas.

Dietas experimentales. Se formularon tres dietas para sustituir la complementación con caña de azúcar por pulpa de cítrico: 0, 50 y 100 %. Estas se ajustaron para suplir los requerimientos nutricionales de vacas lecheras (480 kg PV) de tercera lactancia, con una producción (corregida al 4 % de grasa) de 12 kg/vaca/día y un consumo de alimento de 14 kg MS/vaca/día (NRC, 2001). Los datos correspondientes a los ingredientes y la composición de las dietas en estudio aparecen en la tabla 2.

Producción de gas *in vitro*

Características, manejo y alimentación de los animales donantes. Para las incubaciones *in vitro* se usaron, como donantes del inóculo ruminal, dos

vacas de la raza Limousin, clínicamente sanas, canuladas en el saco dorsal del rumen. Los animales se encontraban en estabulación, alimentados *ad libitum* con una dieta constituida por 35,8 % de heno de alfalfa (*Medicago sativa*); 47,2 % de paja de avena (*Avena sativa*); 14,0 % de maíz (*Zea mays*) molido y 3,0 % de harina de soya (*Glycine max*). Se les suministró alimento dos veces al día (08:00 y 16:00 h) y tuvieron libre acceso al agua potable.

Obtención del inóculo ruminal. El fluido ruminal se extrajo de múltiples sitios del rumen de las dos vacas en igual cantidad, a las 6:30 h, antes de la oferta del alimento matutino. Para ello, se retiró manualmente el contenido del rumen y se exprimió en envases térmicos previamente calentados con agua a 40 °C, para su traslado al laboratorio de nutrición animal. El fluido ruminal se filtró en triple capa de gasa y lana de vidrio; posteriormente, se mantuvo por 30 min a 39 °C y fue continuamente saturado con CO₂.

Incubaciones *in vitro*. El ensayo de producción de gas *in vitro* se realizó de acuerdo con lo recomendado por Theodorou *et al.* (1994). Se emplearon frascos ampulla de 125 mL, a los cuales se les introdujo 700 (\pm 0,002) mg de MS de *M. maximus*, 100 (\pm 0,001) mg de MS de *L. leucocephala* y 200 (\pm 0,002) mg de *S. officinarum* y/o pulpa de cítrico (según las proporciones descritas en la tabla 2).

La solución de incubación se elaboró a partir de una mezcla de macro- y microminerales, una solución tampón de bicarbonato, agua destilada, solución reductora y resazurina como indicador de reducción. Se realizó gaseo con CO₂, según la técnica de Menke y Steingass (1988), y se agregaron 90 mL de disolución a cada frasco, así como 10 mL de fluido ruminal.

Se realizaron tres series de incubación, en las que se incluyeron tres frascos por muestra y tres

Tabla 1. Composición química (g/kg MS) de los alimentos utilizados en las dietas

Composición química*	Alimento			
	<i>M. maximus</i>	<i>L. leucocephala</i>	Pulpa de cítrico	<i>S. officinarum</i>
Materia seca [□]	309,1	311,8	188,3	254,5
Materia orgánica	834,0	909,6	955,5	949,4
Proteína bruta	122,0	233,0	64,3	23,1
Fibra en detergente neutro	659,1	529,6	306,9	607,2
Fibra en detergente ácido	343,2	270,0	209,6	334,3
Lignina en detergente ácido	55,9	151,4	43,8	67,8

*Todos los valores, excepto la MS, están expresados en base a MS.

[□]La materia seca está expresada en g MS/kg de materia fresca.

Tabla 2. Composición química (g/kg MS) e ingredientes (%) de las dietas.

Indicador	Dieta		
	Control	PC10	PC20
Composición química			
Materia seca [□]	939,6	940,7	941,8
Materia orgánica	874,1	874,8	875,4
Ceniza	125,9	125,2	124,6
Proteína bruta	104,6	108,7	112,9
Fibra en detergente neutro	666,0	635,9	605,9
Fibra en detergente ácido	333,3	320,8	308,3
Celulosa	260,5	250,5	240,4
Hemicelulosa	332,7	315,0	297,5
Lignina en detergente ácido	72,7	70,3	68,0
Ingredientes (% como alimento base)			
<i>Megathyrus maximus</i>	70	70	70
<i>Leucaena leucocephala</i>	10	10	10
Ingredientes (% como complemento)			
Caña de azúcar	20	10	0
Pulpa de cítrico	0	10	20

[□] La materia seca está expresada en g MS/kg de materia fresca.

controles negativos (blanco) solo con el inóculo. Para las series de incubación se utilizó paja de avena como estándar.

El contenido de los frascos se homogenizó, y estos se incubaron para iniciar el registro de la producción acumulada de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h de incubación. Al finalizar la incubación, el contenido de cada botella se filtró usando crisoles de vidrio porcelana de porosidad 1 (100 a 160 µm de tamaño de poro, Pyrex, Stone, UK) bajo presión. Los residuos de la fermentación se secaron a 60 °C durante 48 h para estimar la DIVMS₉₆.

Cálculos. La presión generada por el gas que se acumula en la parte superior de los frascos se midió mediante un transductor de presión (marca Delta OHM, modelo HD 8804) conectado a un lector digital. La transformación de los valores de presión a volumen de gas se realizó usando una ecuación obtenida mediante análisis de regresión:

$$Y = (2,7384X) - 0,0243$$

Donde:

Y: volumen de gas (mL), X: presión (psi); R² = 0,99

Los datos de producción de gas (mL/g MS) se analizaron por medio de la opción NLIN del paquete estadístico SAS (2002), utilizando el modelo de France *et al.* (2000):

$$A = b \times [1 - e^{-c(t-L)}]$$

Donde:

A: volumen de producción de gas (PG) en el tiempo *t*, *b*: asíntota de la producción de gas (mL/g MS), *c*: tasa de producción de gas (/h), *L* (h): tiempo Lag.

Los parámetros REL₁ y REL₂ se calcularon a partir de la proporción entre la PG₄₈ y la PG₉₆ (REL₁) y la proporción entre la PG₉₆ y *b* (REL₂) (Bueno *et al.*, 2005).

La digestibilidad de la materia orgánica (DMO₂₄) se estimó de acuerdo con Menke *et al.* (1979), como sigue:

$$\text{DMO}_{24} (\text{g/kg MS}) = 148,8 + 8,89 \text{ PG}_{24} + 4,5 \text{ PB} + 0,651 \text{ A}$$

Donde:

PG₂₄: PG neta (mL/200 mg MS) a las 24 h, PB: proteína bruta (% MS), A: ceniza (% MS).

La energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) se estimó de acuerdo con el procedimiento de Menke y Steingass (1988), por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{EM (MJ/kg MS)} = 2,20 + 0,136 \text{ PG}_{24} (\text{mL/200mg MS}) + 0,057 \text{ PB}$$

Donde:

PG₂₄: volumen de gas a las 24 h, PB (% MS): contenido en proteína bruta del alimento.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se calcularon de acuerdo con la ecuación de Getachew *et al.* (2002):

$$\text{AGCC (mmol/200 mg MS)} = 0,0222 \text{ PG}_{24} - 0,00425$$

Donde:

PG_{24} : producción neta de gas a las 24 h (mL/200 mg MS).

Diseño experimental y análisis estadístico.

La producción de gas *in vitro*, los parámetros de la producción de gas (*b*, *c*, *L*), la degradabilidad *in vitro* (DMO_{24} y DIVMS_{96}), la EM y los AGCC se compararon (previa comprobación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad en las varianzas) mediante un análisis de varianza (SAS Institute, 2002), en un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos (dietas experimentales) y tres repeticiones. Las diferencias entre los promedios se determinaron a través del test de comparación de rangos múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1980). Además, se realizó un análisis de contraste lineal y cuadrático del nivel de pulpa de cítrico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los SSP, caracterizados por asociaciones de gramíneas mejoradas con leguminosas arbóreas como *L. leucocephala*, con densidad de plantas por hectárea media y alta, aportan una dieta de elevada calidad nutricional para vacas lecheras, fundamentalmente en

cuanto a la digestibilidad y el contenido de PB; sin embargo, esta dieta resulta insuficiente en relación con los requerimientos de energía, para una adecuada producción de leche. Por ello, la sustitución parcial de un alimento abundante en el trópico pero con un valor nutricional relativamente bajo, como el forraje de caña de azúcar, por un subproducto agroindustrial potencialmente contaminante del ambiente pero con un valor nutricional más elevado, como la PC, permitiría incrementar la degradabilidad de la fibra y, por consiguiente, de la MS, así como mejorar el balance de energía de la ración.

El contenido en PB de las dietas (105-113 g/kg MS) excedió el mínimo (80 g/kg MS) que se considera como el límite a partir del cual se puede afectar el crecimiento de las bacterias en el rumen (Ramírez, 1998).

En la figura 1 se presenta el perfil de producción acumulada de gas (mL/g MS) para las tres dietas durante 96 h de incubación. La PG aumentó rápidamente en las primeras 12 h de la fermentación, con valores superiores para las dietas PC10 y PC20. Entre las 12 y 24 h de incubación hubo una ligera disminución de la PG en todas las dietas, pero se mantuvo la misma tendencia en cuanto a la diferencia, por lo que se incrementó el contraste en la PG acumulada de las dietas PC10 y PC20 con respecto al control. La divergencia aumentó aún

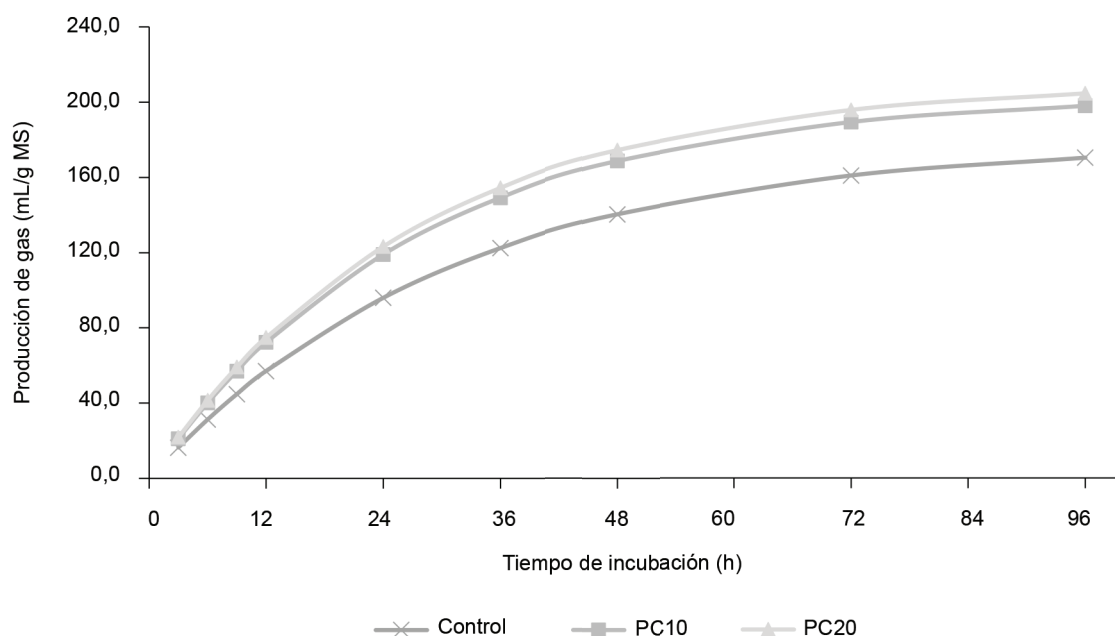


Figura 1. Perfiles de producción de gas *in vitro* de las dietas con diferente nivel de sustitución de caña de azúcar por pulpa de cítrico.

más entre las 24 y las 48 h de incubación; mientras que a partir de ese momento mantuvo la misma tendencia hasta las 96 h de fermentación.

El incremento de la PG de las dietas experimentales (PC10 y PC20) durante todo el proceso de fermentación, indica que estas tenían una mayor concentración de energía y una digestibilidad superior, ya que la cantidad de gas que se produce mediante la incubación *in vitro* de un sustrato está intrínsecamente relacionada con su digestibilidad y, por tanto, con su valor energético (Getachew *et al.*, 2004; Van Dung *et al.*, 2014).

Por otra parte, al aumentar la PC en la dieta se redujo el contenido de FDN, lo cual también pudo coadyuvar al incremento de la producción de gas (Soltan *et al.*, 2012).

El aumento de la producción de gas a las 24 h en las dietas PC10 y PC20 indica que el nitrógeno degradable tampoco limitó la actividad microbiana, lo que permitió que la fracción de carbohidratos se degradara de acuerdo con su potencial (Hamid *et al.*, 2007). Por tanto, la sincronización entre el aporte de energía, a partir de la fermentación de los carbohidratos, y la contribución en nitrógeno, mediante la degradación de las proteínas, es esencial para lograr una adecuada eficiencia de la fermentación ruminal (López *et al.*, 2014).

La sustitución de la caña de azúcar por pulpa de cítrico incrementó linealmente ($p < 0,001$) la PG acumulada a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. También, incrementó de forma lineal ($p < 0,001$) la producción asintótica de gas (b) y la tasa fraccional de producción de gas (c); mientras que el tiempo de inicio para la fermentación de la fracción insoluble pero potencialmente fermentable (fase lag, L) disminuyó linealmente ($p < 0,001$).

El incremento lineal de la producción asintótica y de la tasa fraccional de producción de gas con el aumento de la PC en la dieta pudo ocurrir debido a una mayor disponibilidad de nutrientes para la microbiota ruminal, en especial nitrógeno (Calabro *et al.*, 2012), carbohidratos solubles y fibra soluble presentes en este alimento (Lashkari y Taghizadeh, 2015).

Cuando hay un mayor contenido de nitrógeno disponible en presencia de suficientes carbohidratos, la célula bacteriana toma más aminoácidos, lo cual conduce a un acelerado crecimiento microbiano y, en consecuencia, a un incremento de la fermentación con mayor producción de gas (Berumen *et al.*, 2015).

Al calcular la relación entre la PG_{48} y la PG_{96} (REL_1) y la correspondencia de la PG_{96} con b (REL_2)

se observó que las dietas PC10 y PC20 acrecentaron estos dos indicadores en 0,03 y 0,02 unidades, respectivamente, en comparación con la dieta control.

La proporción de la fermentación que se desarrolla en las primeras 48 h de incubación (REL_1), así como la relación entre la producción total de gas (PG_{96}) y el potencial de producción de gas (b) del alimento (REL_2) constituyen un nuevo enfoque para evaluar los alimentos y/o las dietas (Sallam *et al.*, 2007). En tal sentido, el incremento en los valores de estos dos parámetros en PC10 y PC20 mostró el aumento en la calidad de ambas con respecto a la dieta control.

Aunque el gas es un producto de desecho de la nutrición, provee bases útiles a partir de las cuales se puede predecir la DMO, la EM y la producción de AGCC (Babayemi, 2006).

El incremento de la pulpa de cítrico aumentó linealmente ($p < 0,001$) la DMO_{24} y la $DIVMS_{96}$ ($p < 0,01$), así como la EM y los AGCC ($p < 0,001$). El valor de la digestibilidad de la materia orgánica es un buen indicador de la cantidad de alimento que está accesible para los microorganismos del rumen (Abiola-Olagunju *et al.*, 2015).

La dieta control, con un 20 % de caña en su composición, manifestó los menores valores tanto para la DMO_{24} como para la $DIVMS_{96}$. La caña de azúcar se reconoce como una fuente de energía, principalmente de carbohidratos solubles de alta digestibilidad, con bajo contenido de proteína y elevado contenido de fibra indigestible (Romão *et al.*, 2014).

Por tanto, la mayor proporción de carbohidratos solubles presentes en la dieta control pudo causar cierta depresión en la digestibilidad de la FDN del forraje por la población celulolítica ruminal. El efecto inhibitorio de los carbohidratos disponibles en las bacterias celulolíticas del rumen, puede suceder aun cuando el pH ruminal se mantenga por encima de 6 (Miron *et al.*, 2002). Como se ha demostrado en estudios previos (Miron *et al.*, 1997), probablemente ese efecto esté relacionado con la preferencia de las especies bacterianas por utilizar los carbohidratos disponibles, en vez de invertir energía para la producción de orgánulos de adhesión y enzimas celulolíticas.

Por el contrario, cuando se sustituyó la caña de azúcar por pulpa de cítrico al 50 y al 100 %, se incrementó tanto la DMO_{24} como la $DIVMS_{96}$, lo cual indica que hubo un aumento en la digestión de la FDN de la dieta.

En la pulpa de cítrico, aproximadamente el 80 % de la MS está constituida por carbohidratos

Tabla 3. Características de la fermentación *in vitro* de dietas basadas en *M. maximus* y *L. leucocephala* con diferentes niveles de sustitución de *S. officinarum* por pulpa de cítrico.

Indicador	Dieta			EEM	Efecto, P	
	Control	PC10	PC20		Lineal	Cuadrático
Producción de gas (mL/ g MS)						
PG ₂₄	96,1 ^b	119,1 ^a	123,3 ^a	4,32	0,001	0,003
PG ₄₈	140,5 ^b	168,8 ^a	174,6 ^a	5,38	0,001	0,005
PG ₇₂	161,0 ^b	189,5 ^a	195,9 ^a	5,49	0,001	0,009
PG ₉₆	170,5 ^b	198,1 ^a	204,7 ^a	5,38	0,001	0,013
Parámetros de la producción de gas						
b	178,7 ^b	204,3 ^a	211,0 ^a	5,09	0,001	0,022
c	0,032 ^b	0,037 ^a	0,037 ^a	0,0008	0,001	0,003
L	2,43 ^a	1,61 ^b	1,67 ^b	0,137	0,001	0,003
REL ₁	0,82	0,85	0,85	-	-	-
REL ₂	0,95	0,97	0,97	-	-	-
Degradabilidad <i>in vitro</i> de la MS y utilización de la energía						
DMO ₂₄	376,5 ^c	415,8 ^b	427,0 ^a	7,77	0,001	0,007
DIVMS ₉₆	506,9 ^b	549,9 ^{ab}	608,8 ^a	17,14	0,01	0,721
EM	5,41 ^b	6,06 ^a	6,20 ^a	0,124	0,001	0,003
AGCC	0,42 ^c	0,52 ^b	0,55 ^a	0,019	0,001	0,003

a, b, c: promedios con diferentes superíndices en una misma fila difieren ($p < 0,05$). EEM: error estándar de los promedios ($n = 3$). PG: producción de gas (mL/g MS a las 24, 48, 72 y 96 h); b: producción asintótica de gas (mL/g MS); c: tasa fraccional de producción de gas (/h); L: tiempo lag (h). REL₁: PG₄₈/PG₉₆, donde PG₄₈ y PG₉₆: producción acumulada de gas a las 48 y 96 h de incubación, respectivamente; REL₂: PG₉₆/b, donde b: producción potencial de gas. DMO: degradabilidad de la materia orgánica; DIVMS: degradabilidad *in vitro* de la materia seca (g/kg MS); EM: energía metabolizable (MJ/kg MS); AGCC: concentración de ácidos grasos de cadena corta (mmol).

(Lashkari y Taghizadeh, 2015), de los cuales cerca del 35 % son carbohidratos solubles que pueden fermentar fácil y rápidamente. Además, más del 36 % es fibra soluble, como la pectina, la que se puede utilizar igualmente por los microorganismos del rumen como una fuente de energía fermentable (Lashkari y Taghizadeh, 2013).

En tal sentido, Arthington *et al.* (2002) plantearon que la pulpa de cítrico tiene en su composición una elevada concentración de pectinas (aproximadamente 250 g/kg MS), que son altamente digestibles: > 980 g/kg MS (Hall *et al.*, 1998; Arthington *et al.*, 2002); ello condiciona su rápida degradación en el rumen y la liberación de energía para un vertiginoso crecimiento microbiano (Gholizadeh y Naserian, 2010). Además, como la pectina se considera una fibra soluble, su fermentación produce más acetato (Liu *et al.*, 2014) y menos lactato que el almidón (Hall *et al.*, 1998) y que los carbohidratos solubles (Dušková y Marounek, 2001), creando mejores condiciones en el rumen para la fermentación de la fibra (Gholizadeh y Naserian, 2010).

Zhao *et al.* (2013), con el uso de la técnica de simulación de rumen, informaron que cuando se incrementó la fibra soluble en detergente neutro hubo una menor producción de N amoniacal y un mayor flujo diario de N en forma de *pellets* sólidos de asociaciones microbianas, así como de microorganismos totales; además, se constató una mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana.

Por otra parte, en estudios *in situ* se ha encontrado que la proteína verdadera de los ensilajes (Lashkari *et al.*, 2014) y de los pastos (Ramírez *et al.*, 2004) incrementa la degradabilidad efectiva de la MS. Por tanto, el mayor contenido en PB de la pulpa de cítrico con respecto a la caña de azúcar, así como de las dietas PC10 y PC20 en relación con el control, es un efecto que también pudo incidir en el aumento de la DMO₂₄ y la DIVMS₉₆ en las dietas experimentales.

La pulpa de cítrico tiene un elevado potencial de degradación ruminal y una alta digestibilidad aparente (Lashkari y Taghizadeh, 2013); por ello,

cuando este alimento aumenta su proporción en las dietas basadas en forrajes contribuye a incrementar tanto la DMO_{24} como la $DIVMS_{96}$.

Los valores de la DMO_{24} para PC10 y PC20 (41,6 y 42,7 %, respectivamente) fueron similares al informado por Tona (2014), de 42,4 %, en una dieta constituida por 60 % de *M. maximus*, 30 % de *Gliricidia sepium* y 10 % de cáscara de yuca (*Manihot esculenta*). Sin embargo, en el presente estudio tanto la EM (6,06-6,20 MJ/kg MS) como los AGCC (0,52-0,55 mmol) estuvieron en un rango superior a los valores reportados por dicho autor (5,52 MJ/kg MS y 0,35 mmol).

La producción de gas, que generalmente es un buen indicador de la digestibilidad (Sommart *et al.*, 2000), mostró el mismo comportamiento que la $DIVMS$. Ello coincide con los resultados de Hernández *et al.* (2012), quienes evaluaron raciones completas constituidas por grano de sorgo, harina de soya, urea, melaza, *Cenchrus ciliaris*, premezcla mineral y distintos niveles de inclusión de PC (0, 10, 20 y 30 % del total de la MS); y hallaron un incremento lineal en la PG, la $DIVMS$, la EM y los AGCC con el aumento de la PC en la dieta.

Lo anterior indica que con el aumento de la PC mejora el perfil de nutrientes de la dieta (Hernández *et al.*, 2012) y con ello la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos ruminales (Paya *et al.*, 2007), fundamentalmente carbohidratos fermentables y nitrógeno disponible, lo cual a su vez estimula el metabolismo de los microorganismos del rumen (Harikrishna *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La sustitución, tanto parcial como total, de caña de azúcar por pulpa de cítrico, como complemento de una dieta basada en *M. maximus* y *L. leucocephala*, contribuyó a incrementar la producción de gas y a mejorar los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* y la utilización de la energía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dirección de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas por permitir la realización del estudio en la lechería 66 de la granja Triunvirato, a la Secretaría de Educación Pública de los Estados Unidos Mexicanos por brindar el financiamiento para una beca de estudios de investigación, y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México en cuyos laboratorios se hizo el trabajo *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, N. A.; El-Adawy, M.; Mariezcurrena-Berasain, M. A.; Salem, A. Z. M.; Olivares-Pérez, J.; Kholif, A. E. *et al.* Effects of exogenous enzymes, *Lactobacillus acidophilus* or their combination on feed performance response and carcass characteristics of rabbits fed sugarcane bagasse. *J. Integr. Agric.* 14:544-549, 2015.
- Abiola-Olagunju, O.; Mako, A. A. & Adeyosoye, O. I. Assessment of nutritive value in mixtures of oilpalm slurry and cassava peels using *in vitro* gas production techniques. *JEBAS.* 3 (V):464-470, 2015.
- Academia de Ciencias de Cuba. *Nuevo Atlas Nacional de Cuba*. La Habana: Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía, 1989.
- Álvarez, F. J. *Experiencia con la caña de azúcar integral en la alimentación animal en México*. Roma: FAO Document Repository. <http://www.fao.org/docrep/003/s8850e/S8850E06.htm>. [02/06/2013], 2012.
- AOAC. *Official methods of analysis*. 15th ed. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemistry, 1990.
- Arthington, J. D.; Kunkle, W. E. & Martin, A. M. Citrus pulp for cattle. The Veterinary Clinics of North America. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 18 (2):317-326, 2002.
- Arthington, J. D. & Pate, F. M. *Estimating de value of wet citrus pulp for Florida cattlemen*. Gainesville, USA: Florida Cooperative Extension Service, University of Florida. EDIS Publication AN108, 2001.
- Babayemi, O. J. Antinutritional factors, nutritive value and *in vitro* gas production of foliage and fruit of *Enterolobium cyclocarpum*. *World J. Zool.* 1 (2):113-117, 2006.
- Bakhashwain, A. A.; Sallam, S. M. A. & Allam, A. M. The use of *in vitro* gas production technique to investigate the associative effect of a desert plant with high quality forage. *Alex. J. Agric. Res.* 54:25-32, 2009.
- Bampidis, V. A. & Robinson, P. H. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 128:175-217, 2006.
- Berumen, Leslie; Páez, J.; Soto, N. O.; Murillo, M.; Herrera, Esperanza & Muro, A. Chemical composition, *in vitro* gas production and energetic value of prickly pear fermented with and without *Kluyveromyces marxianus*. *J. BioSci. Biotechnol.* 4 (3):359-364, 2015.
- Bueno, I. C. S.; Cabral-Filho, S. L. S.; Gobbo, S. P.; Louvandini, H.; Vitti, D. M. S. S. & Abdalla, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123-124:95-105, 2005.

- Calabro, S.; Guglielmelli, A.; Jannaccone, F.; Daniels, P. P.; Tudisco, R.; Ruggiero, C. *et al.* Fermentation kinetics of sainfoin hay with and without PEG. *J. Physiol Anim. Nutr.* 96:842-749, 2012.
- Centro del Clima. *El clima de Cuba. Características generales*. La Habana: Instituto de Meteorología. <http://www.insmet.cu/asp/genesis.asp?TB0=PLAN-TILLAS&TB1=CLIMAC&TB2=/clima/ClimaCuba.htm>. [30/09/2013], 2013.
- Dušková, D. & Marounek, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Lett. App. Microbiol.* 33 (2):159-163, 2001.
- Fernández, J. M. Generación de subproductos de la industria agroalimentaria: situación y alternativas para su aprovechamiento y revalorización. *Especial Alimentaria*. (No. Extra):39-42, 2008.
- France, J.; Dijkstra, J.; Dhanoa, M. S.; López, S. & Bannink, A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83:143-150, 2000.
- Fundora, O.; Franzolin, R.; Castañeda, Paola C.; Bautista, Irma S. & Peña, Yuli A. Comportamiento y conducta alimentaria de búfalos de río de la raza Mediterránea, alimentados con raciones de ensilajes de maíz y de caña de azúcar en diferentes proporciones. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 47 (2):155-158, 2013.
- Gado, H. M.; Salem, A. Z. M.; Odongo, N. E. & Borhami, B. E. Effect of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion, blood metabolites and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 165:131-136, 2011.
- Gado, H. M.; Salem, A. Z. M.; Robinson, P. H. & Hassan, M. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 154:36-46, 2009.
- Getachew, G.; Makkar, H. P. S. & Becker, K. Tropical browses: contents of phenolics compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agric. Sci.* 139:341-352, 2002.
- Getachew, G.; Robinson, P. H.; De Peters, E. J. & Taylor, S. J. Relationships between chemical compositions, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 111:57-71, 2004.
- Gholizadeh, H. & Naserian, A. A. The effects of replacing dried citrus pulp with barley grain on the performance of Iranian Saanen kids. *J. Anim. Vet. Adv.* 9 (15):2053-2056, 2010.
- Hall, M. B.; Pell, A. N. & Chase, L. E. Characterization of neutral detergent soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 70:23-39, 1998.
- Hamid, P.; Akbar, T.; Hossein, J. & Gholan-Ali, M. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the *in vivo* and *in vitro* gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2:108-113, 2007.
- Harikrishna, C.; Mahender, M.; Ramana Reddy, Y.; Gnana Prakash, M.; Sudhakar, K. & Pavani, M. Evaluation of *in vitro* gas production and nutrient digestibility of complete diets supplemented with different levels of thermotolerant yeast in Nellore rams. *Vet. World.* 5 (8):477-485, 2012.
- Hernández, A.; Pérez, J. M.; Bosch, D. & Castro, N. *Clasificación de los suelos de Cuba*. San José de las Lajas, Cuba: Instituto de Suelos, Ediciones INCA, 2015.
- Hernández, J.; Rojo, R.; Salem, A. Z. M.; Mirzaei, F.; González, A.; Vázquez, J. F. *et al.* Influence of different levels of dried citrus pulp on *in vitro* ruminal fermentation kinetics of total mixed ration in goat rumen inocula. *J. Anim. Feed Sci.* 21:458-467, 2012.
- Herrera, R. S. Métodos de muestreo en pastos y suelo. En: *Fisiología, producción de biomasa y sistemas silvopastoriles en pastos tropicales. Abono orgánico y biogás*. San José de las Lajas, Cuba: Instituto de Ciencia Animal. p. 89-108, 2006.
- Lashkari, S. & Taghizadeh, A. Digestion kinetics of carbohydrate fractions of citrus by-products. *Vet. Res. Forum.* 6 (1):41-48, 2015.
- Lashkari, S. & Taghizadeh, A. Nutrient digestibility and evaluation of protein and carbohydrate fractionation of citrus by-products. *J. Anim. Phys. Anim. Nut.* 97 (4):701-709, 2013.
- Lashkari, S.; Taghizadeh, A.; Seifdavati, J. & Salem, A. Z. M. Qualitative characteristics, microbial populations and nutritive values of orange pulp ensiled with nitrogen supplementation. *Slovak J. Anim. Sci.* 47 (2):90-99, 2014.
- Liu, J.; Pu, Y.-Y.; Xie, Q.; Wang, J.-K. & Liu, J.-X. Pectin induces an *in vitro* rumen microbial population shift attributed to the pectinolytic Treponema group. *Curr. Microbiol.* 70 (1):67-74, 2014.
- López, O. *Caracterización del comportamiento productivo y reproductivo de vacas Mambí de Cuba de primera lactancia en un sistema silvopastoril*. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Reproducción Animal. La Habana: CENSA, UNAH, 2003.
- López, O.; Olivera, Yuseika; Lamela, L.; Sánchez, Tania; Montejo, I. L.; Ronquillo, M. *et al.* Efecto de la suplementación con concentrado en la fermentación *in vitro* de dietas para vacas lecheras en silvopastoreo. *Pastos y Forrajes.* 37 (4):426-434, 2014.
- Martín, M. P. C. *La alimentación del ganado con caña de azúcar y sus subproductos*. La Habana: Instituto de Ciencia Animal, 2004.
- Menezes, G. C. de C.; Valadares Filho, S. de C.; Magalhães, F. A.; Valadares, R. F. D.; Prados, Laura F.; Detmann, E. *et al.* Intake and performance of confined bovine fed fresh or ensilaged sugar

- cane based diets and corn silage. *Rev. Bras. Zootecn.* 40 (5):1095-1103, 2011.
- Menke, K. H.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D. & Schneider, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:217-222, 1979.
- Menke, K. H. & Steingass, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-45, 1988.
- Miron, J.; Ben-Ghedalia, D. & Solomon, R. Digestibility by dairy cows of monosaccharide components in diets containing either ground sorghum or sorghum grain treated with sodium hydroxide. *J. Dairy Sci.* 80:144-151, 1997.
- Miron, J.; Yosef, E.; Ben-Ghedalia, D.; Chase, L. E.; Bauman, D. E. & Solomon, R. Digestibility by dairy cows of monosaccharide constituents in total mixed rations containing citrus pulp. *J. Dairy Sci.* 85:89-94, 2002.
- Mirzaei-Aghsaghali, A. & Maheri-Sis, N. Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants. A review. *World J. Zool.* 3 (2):40-46, 2008.
- NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th rev. ed. Washington D. C.: Natl. Acad. Sci., 2001.
- Paya, H.; Taghizadeh, A.; Janmohammadi, H. & Moghadam, G. A. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the *in vivo* and *in vitro* gas production techniques. *Amer. J. Anim. Vet. Sci.* 2 (4):108-113, 2007.
- Ramírez, C. L. *Consumo, digestión ruminal y suministro de nitrógeno microbiano al duodeno en ovinos alimentados con pasto Taiwán (Pennisetum purpureum) suplementados con follaje de árboles*. Tesis de Maestría. Mérida, México: Universidad Autónoma de Yucatán, 1998.
- Ramírez, R. G.; Haenlein, G. F. W.; García-Castillo, C. G. & Núñez-González, M. A. Protein, lignin and mineral contents and *in situ* dry matter digestibility of native Mexican grasses consumed by range goats. *Small Ruminant Res.* 52 (3):261-269, 2004.
- Rodríguez, D.; Martín, P. C.; Alfonso, F.; Enríquez, Ana V. & Sarduy, Lucía. Frecuencia del suministro de concentrado como suplemento en dietas con forraje de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), y su efecto en el comportamiento productivo de toros mestizos Holstein. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 47 (2):151-154, 2013.
- Romão, C. O.; Carvalho, G. G. P.; Leite, V. M.; Santos, A. S.; Chagas, D. M. T.; Ribeiro, O. L. *et al.* Chemical composition and dry matter digestibility of sugar cane oxide treated with calcium. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66 (2):529-538, 2014.
- Sallam, S. M. A.; Nasser, M. E. A.; El-Waziry, A. M.; Bueno, I. S. C. & Abdalla, A. L. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. *J. Appl. Sci. Res.* 3:34-41, 2007.
- Salvador, Ana; Igual, Marta; Contreras, Carolina; Martínez-Navarrete, Nuria & Camacho, María del M. Effect of the inclusion of citrus pulp in the diet of goats on cheeses characteristics. *Small Ruminant Res.* 121:361-367, 2014.
- SAS Institute. *SAS User's Guide: Statistics. Version 9.0*. Cary, USA: SAS Institute. 2002.
- Soltan, Y. A.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M. A.; Louvandini, H. & Abdalla, A. L. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21:759-772, 2012.
- Sommart, K. D.; Parker, S.; Rowlinson, P. & Wanapat, M. Fermentation characteristics and microbial protein synthesis in an *in vitro* system using cassava, rice, straw and dried ruzi grass as substrates. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:1084-1093, 2000.
- Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. *Principles and procedures of statistics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill International, 1980.
- Theodorou, M. K.; Williams, B. A.; Dhanoa, M. S.; McAllan, A. B. & France, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48:185-197, 1994.
- Tona, G. O. Investigation of proximate composition and *in vitro* fermentation characteristics of *Panicum maximum*, *Gliricidia sepium* with cassava peels as feed for ruminants in Nigeria. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3 (10):188-197, 2014.
- Van Dung, D.; Shang, W. & Yao, W. Effect of crude protein levels in concentrate and concentrate levels in diet on *in vitro* fermentation. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27 (6):797-805, 2014.
- Van Soest, P. J.; Robertson, J. B. & Lewis, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597, 1991.
- Volanis, M.; Zoiopoulos, P.; Panagou, E. & Tzerakis, C. Utilization of an ensiled citrus pulp mixture in the feeding of lactating dairy ewes. *Small Ruminant Res.* 64:190-195, 2006.
- Zhao, Xiang-hui; Liu, Chan-juan; Li, Chao-yun & Yao, Jun-hu Effects of neutral detergent soluble fiber and sucrose supplementation on ruminal fermentation, microbial synthesis, and populations of ruminal cellulolytic bacteria using the Rumen Simulation Technique (RUSITEC). *J. Integr. Agric.* 12 (8):1471-1480, 2013.