

Efectos sobre la fermentación *in vitro* de la inclusión de proporciones crecientes de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad

Effects of the inclusion of increasing proportions of citrus pulp, corn or barley to a high quality pasture on the *in vitro* fermentation

Britos A.^{1*}, Pomiés N.¹, Repetto J.L.²,
Cajarville C.¹

Recibido: 24/10/2012
Aprobado: 01/03/2013

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos de la inclusión de proporciones crecientes (desde 0 a 100%) de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad sobre la fermentación *in vitro*. Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* y los datos de volumen de gas fueron ajustados a un modelo exponencial simple con tiempo de latencia. El efecto de la proporción de los concentrados fue estudiado utilizando PROC MIXED de SAS[®] incluyendo como efectos fijos el concentrado, la proporción en el sustrato y la interacción entre ambos. Debido a que las interacciones concentrado*proporción fueron significativas, para describir el impacto del aumento de la proporción de cada concentrado en el sustrato se realizaron regresiones lineales y cuadráticas mediante PROC GLM de SAS[®].

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of inclusion of increasing proportions (from 0 to 100%) of citrus pulp, corn or barley to high quality pasture on *in vitro* fermentation. The *in vitro* gas production technique was used and the gas volume data were fitted to a simple exponential model with lag time. The effect of the proportion of the concentrates was studied using PROC MIXED of SAS[®] including as fixed effects the concentrate, the proportion into the substrate and the interaction among them. Since interactions concentrate*proportion were significant, linear and quadratic regression analysis were performed to describe the impact of increasing the proportion of each concentrate in the substrate using PROC GLM of SAS[®]. Increasing concentrate proportion enhanced the gas volume (mL/g OM

¹Departamento de Nutrición, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay;
²Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. *britos.arcaus@gmail.com

El aumento de la proporción de concentrado incrementó el volumen de gas (mL/g MO incubada) y disminuyó la velocidad de producción, de forma diferente según el concentrado incluido. El tiempo de latencia se incrementó hasta el nivel máximo de inclusión de los cereales, pero la pulpa de citrus aumentó el tiempo hasta el 48% de inclusión. El aumento de la proporción de diferentes concentrados en el sustrato causó comportamientos similares de la producción potencial y de la tasa de producción de gas, aunque con características propias según el concentrado incluido. Aunque la pulpa de citrus no afecte la adherencia de la microbiota ruminal en la misma extensión que los cereales podría sustituirlos al suplementar pasturas de alta calidad y causar efectos similares a nivel ruminal.

PALABRAS CLAVE:

Concentrados fibrosos, almidón, suplementación.

INTRODUCCIÓN

La suplementación de dietas forrajeras con granos ocasiona efectos asociativos con importantes consecuencias a nivel productivo (Dixon y Stockdale, 1999). Los efectos asociativos positivos están vinculados al aporte de nutrientes limitantes para el rumiante o para la microbiota ruminal; estos efectos usualmente suceden cuando los concentrados suplementan forrajes de baja calidad y están ligados

incubated) and decreased the production rate, in different ways according to the concentrate included. Lag time increased up to the maximum level of inclusion of the cereals, but citrus pulp increased the lag time until 48% of inclusion. Increasing the proportion of different concentrates into the substrate caused similar behaviors of the potential gas production and the gas production rate, even though with own characteristics according to the concentrate included. Although citrus pulp does not affect ruminal microbiota adhesion at the same extent as cereals, it could replace them in the supplementation of high quality pastures producing similar effects in the rumen.

KEYWORDS:

Fibrous concentrates, starch, supplementation.

al aumento de la digestibilidad de la materia orgánica (Moore y col., 1999). Los efectos negativos ocurren generalmente cuando es incluida en la dieta una gran proporción de concentrados de rápida fermentación y están ligados a una menor ingestión y digestión de forraje debido a la reducción de la tasa de degradación de la fibra por los microorganismos ruminales (Dixon y Stockdale, 1999). Algunos subproductos, como la pulpa de citrus, se catalogan como concentrados fibrosos y se ha indicado que podrían tener efectos

beneficiosos sobre el ambiente ruminal (Bampidis y Robinson, 2006). Además, se ha sugerido que el uso de concentrados fibrosos tendría mayores efectos beneficiosos sobre la producción de leche que los concentrados con alto contenido de almidón, al asociarlos con pasturas de alta calidad (Delahoy y col., 2003). A pesar de estos hechos, es escasa la información sobre el nivel más conveniente de suplementación para cada tipo de concentrado cuando la pastura es de alta calidad. Es así que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sobre la fermentación *in vitro* de la inclusión de proporciones crecientes de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal del Departamento de Nutrición Animal en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria-UdelaR (San José, Uruguay, 34° 41' S y 56° 32' O). Los análisis de composición química de los alimentos se realizaron en el laboratorio de análisis químicos del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria-UdelaR (Montevideo, Uruguay). El manejo del animal donante de líquido ruminal se ajustó a la Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria de la UdelaR.

Diseño experimental

Se prepararon mezclas de pastura de alta calidad con pulpa de citrus, maíz o cebada. Cada concentrado fue incluido en niveles desde 0 a 100% con incrementos de 10%, lo que hizo un total de 31 mezclas. La pastura utilizada para las mezclas fue cortada a 5 cm del suelo y luego secada a 65° C en estufa de aire forzado. La composición química de los componentes individuales incluidos en las mezclas se presenta en el Cuadro 1. Cada mezcla fue utilizada como sustrato para estimar su fermentescibilidad mediante la técnica de determinación de la producción de gas *in vitro*. El líquido ruminal utilizado como inóculo fue colectado de una vaca Holstein en lactación (580 kg de PV), que consumía pastura templada de alta calidad por pastoreo directo (4 h en la mañana y 4 h en la tarde) y heno de pastura.

Técnica de producción de gas *in vitro*

Se introdujeron 0,5 g de sustrato en frascos de fermentación de 125 mL. Se agregó a cada frasco de fermentación 40,5 mL de medio de incubación libre de N (Williams y col., 2005) y a continuación fueron tapados con septos de goma butilo y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 8 horas antes de la inoculación para permitir la hidratación del sustrato. Previo a la inoculación los frascos fueron llevados a un baño María a 39°C donde se mantuvieron por todo el período de mediciones. Inmediatamente a la inoculación con 10 mL de fluido ruminal, cada

Cuadro I. Composiciones químicas de los alimentos, composición botánica y disponibilidad de la pastura utilizadas como sustratos en el experimento I

Alimento	MS (%)	MO (% MS)	PB (% MS)	FDN (% MS)	FDA (% MS)
pastura	13,67	89,46	18,70	37,51	19,91
pulpa de citrus	14,64	96,48	6,86	20,66	15,45
cebada	88,83	97,31	11,21	14,99	4,95
maíz	85,85	98,56	9,90	7,64	1,71

Composición botánica y disponibilidad de la pastura	
Leguminosas (% MS)	56,13
Gramíneas (% MS)	39,04
Restos secos (% MS)	2,46
Malezas (% MS)	2,38
Disponibilidad (kg MS/ha)	4180,3

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido

frasco se tapó con septo de goma butilo y fue sellado con precintos de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂. Cada mezcla fue incubada por triplicado y además tres frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos para corregir la fermentación propia del inóculo.

Las mediciones de presión de gas se realizaron mediante un medidor de presión con transductor (RZ-68601-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h luego de la inoculación. Luego de medida la presión se dejaba insertada una aguja para permitir el escape de gas y se agitaba suavemente para mezclar el contenido de los frascos. La cantidad de gas en mL fue estimada

de acuerdo a la ecuación $V = 4,40P + 0,09P^2$ (V es el volumen de gas en mL y P es la presión observada en psi) obtenida en un experimento previo bajo condiciones similares.

El volumen de gas obtenido de cada frasco de fermentación fue ajustado por regresión no lineal mediante PROC NLIN de SAS® (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) al modelo:

$$V = a(1 - e^{-kd(t-L)})$$

donde “V” (mL/g MS incubada) denota la producción de gas acumulada a tiempo t, “a” (mL/g MO incubada) es la producción potencial de gas; “kd” (h⁻¹) es la tasa fraccional de producción de gas y “L” (h) es el tiempo de latencia de la producción de gas.

Análisis químicos

Las muestras de alimentos se secaron en estufa durante 48 h a 60°C para determinar Materia Seca (MS) y luego se molieron en un molino de rotor provisto de criba de 1 mm (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Alemania). Se determinaron Cenizas y Proteína Bruta (PB) según los métodos 942.05 y 984.13 respectivamente de AOAC (1990). La Materia Orgánica (MO) se calculó por diferencia (% MO = 100 - % de Cenizas). Las determinaciones de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA) se realizaron de acuerdo al método propuesto por Robertson y Van Soest (1981) usando un analizador de fibra ANKOM²²⁰ (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) con α -amilasa termoestable, y fueron expresadas con la ceniza residual incluida.

Análisis estadísticos

Los resultados de la inclusión creciente de cada concentrado sobre la producción potencial, la tasa fraccional y el tiempo de latencia de la producción de gas *in vitro* fue analizado utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS[®] (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + P_j + (C*P)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y es el parámetro de producción de gas *in vitro* estudiado, μ es la media general, C_i es el efecto fijo del concentrado i (i = pulpa de citrus,

maíz o cebada), P_j es el efecto fijo de la proporción de concentrado en el sustrato j ($j = 0$ a 100%, en incrementos de 10%), $(C*P)_{ij}$ es la interacción entre el concentrado i y la proporción de concentrado en el sustrato j y ε_{ijk} es el error residual. La unidad experimental fue el frasco de fermentación.

En los casos en que la interacción entre concentrado y la proporción de concentrado en el sustrato fueron significativas, se utilizaron regresiones lineales y cuadráticas para describir el impacto de la proporción creciente de cada concentrado mediante PROC GLM de SAS[®] (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La unidad experimental fue el frasco de fermentación. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$ y se consideraron tendencias cuando $0,05 < P < 0,10$.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran las respuestas del volumen de gas (1A), de la tasa de producción de gas (1B) y del tiempo de latencia (1C) al incremento de la proporción de pulpa de citrus, maíz o cebada en el sustrato. Las respuestas fueron diferentes según el concentrado incluido, ya que se observaron interacciones significativas entre el concentrado y el nivel utilizado. Por lo tanto, el efecto del aumento de la proporción de concentrado fue analizado mediante regresiones lineales

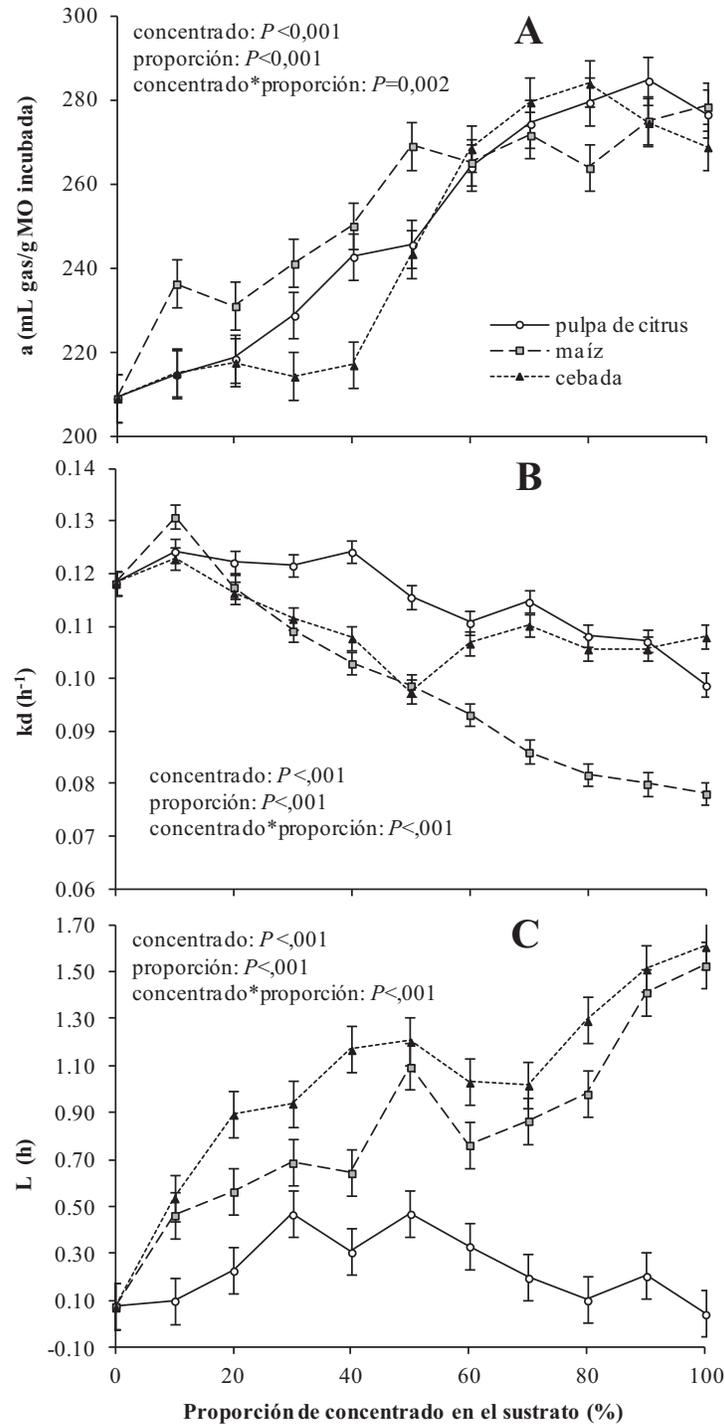


Figura 1. Respuestas de los parámetros de producción de gas *in vitro* al incremento de la proporción de pulpa de citrus, maíz o cebada en el sustrato. **A:** Producción potencial de gas (“a”). **B:** Tasa de producción de gas (“kd”). **C:** Tiempo de latencia (“L”).

y cuadráticas de cada concentrado separadamente (Cuadro 2).

El incremento de las proporciones en el sustrato de pulpa de citrus y cebada provocó aumentos lineales del volumen de gas, mientras que la inclusión de maíz causó un incremento de la producción de gas a tasas decrecientes (lineal: $P < 0,001$; cuadrático: $P = 0,008$). La pendiente de la regresión lineal de la inclusión de maíz fue visiblemente menor que la de cebada y pulpa de citrus (0,61x, 0,82x y 0,83x respectivamente; datos no presentados en el cuadro). Inesperadamente, las velocidades de producción de gas disminuyeron a medida que aumentaba la proporción de concentrados, en el

caso de la inclusión de pulpa de citrus disminuyó una tasa creciente (lineal: $P < 0,001$; cuadrático: $P < 0,001$), con cebada disminuyó a una tasa decreciente (lineal: $P < 0,001$; cuadrático: $P = 0,003$) y el agregado de maíz disminuyó la velocidad a una tasa constante (lineal: $P < 0,001$). El tiempo de latencia aumentó linealmente a medida que se incrementó la proporción de maíz y aumentó a una tasa decreciente cuando se incluyó cebada (lineal: $P < 0,001$; cuadrático: $P < 0,05$). A su vez, la inclusión de pulpa de citrus provocó una respuesta cuadrática del tiempo de latencia, presentando su máxima extensión cuando la proporción de pulpa de citrus alcanzó el 48%.

Cuadro 2. Efectos del incremento del nivel de inclusión de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad sobre los parámetros de producción de gas *in vitro*

Parámetro	Concentrado	Lineal		Cuadrático	
		P	DER	P	DER
a (mL de gas/g de MO incubada)	pulpa de citrus	<,001	9,037	0,088	8,735
	maíz	<,001	11,798	0,008	10,612
	cebada	<,001	15,841	0,571	16,021
kd (h ⁻¹)	pulpa de citrus	<,001	0,005	<,001	0,004
	maíz	<,001	0,006	0,365	0,006
	cebada	<,001	0,006	0,003	0,006
L (h)	pulpa de citrus	0,879	0,179	<,001	0,131
	maíz	<,001	0,244	0,849	0,248
	cebada	<,001	0,234	0,036	0,221

a: Producción potencial de gas (ml de gas /g MO incubada); kd: tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); P: nivel de significación; R²: coeficiente de determinación; DER: desviación estándar de la regresión

DISCUSIÓN

A pesar de que se utilizó una sola fuente de inóculo y que la totalidad de las réplicas se realizaron en una misma corrida, los resultados del trabajo indican diferencias importantes en la fermentación *in vitro* debido a la inclusión de proporciones crecientes de diferentes concentrados. Si bien la inclusión de los 3 concentrados a una pastura de alta calidad provocó aumentos del volumen de gas, el concentrado fibroso (cascarilla de soja) y el cereal de rápida degradación (cebada) presentaron respuestas lineales similares de este parámetro. Esta similitud podría deberse a las altas proporciones de pectinas y FDN fermentable de la pulpa de citrus que llevan a una elevada producción de CH₄ y a una mayor proporción relativa de ácido acético. En ese sentido, Getachew y col. (1998) indican que si la fermentación ruminal *in vitro* produce mayor proporción de ácido acético habrá concomitantemente una mayor producción de gas. Este fenómeno es coincidente con lo reportado por Ariza y col. (2001), que no encontraron diferencias en la digestión de la MO y en la producción de AGV *in vitro* entre dietas con pulpa de citrus o una fuente de almidón. Sin embargo, Barrios-Urdaneta y col. (1997) observaron que el volumen de gas producido por una paja de cebada no fue afectado por la inclusión de cantidades crecientes de pectina, pero la adición de almidón o celulosa lo deprimió de forma lineal; probablemente ese resultado se debe a la muy baja calidad del forraje que los autores utilizaron en

contraste con este trabajo.

Con respecto a la disminución de la velocidad de producción de gas, podría ser atribuida a los orígenes del líquido ruminal, que procedió de una vaca en lactación alimentada exclusivamente con forraje y por lo tanto con una microbiota ruminal más adaptada a la degradación de la fibra que a la de otras fuentes de carbohidratos. A pesar de ello, la inclusión de pulpa de citrus también redujo la velocidad de producción de gas; evidenciando que estos subproductos tienen efectos semejantes a los concentrados altos en almidón. De igual forma, Barrios-Urdaneta y col. (2003) observaron que la incorporación en un concentrado de niveles hasta 83% de pulpa de citrus o cebada causó efectos similares sobre la fermentación ruminal en ovejas que consumían paja de cebada amoniada. Sin embargo, las respuestas de la velocidad de producción de gas a cada concentrado fueron particulares. El aumento de las proporciones en el sustrato de cascarilla de soja y cebada ocasionó efectos cuadráticos, aunque la disminución provocada por la cebada fue a una tasa decreciente probablemente porque su almidón de rápida degradación compensó la disminución al menos parcialmente.

El tiempo de latencia de la producción de gas aumentó sostenidamente con el incremento de la inclusión de los cereales, indicando que la adhesión a las partículas por la microbiota de los líquidos ruminales estaría afectada por el incremento de las

proporciones de almidón. Este efecto también puede ser atribuido al origen del líquido ruminal, ya que la adhesión y colonización bacteriana y la formación del biofilm microbiano son afectadas por cambios en el sustrato (McAllister y col., 1994). No obstante, la pulpa de citrus disminuyó el tiempo de latencia cuando su proporción predominó en el sustrato, probablemente debido al aumento de sustratos para las bacterias celulolíticas que provoca una mayor adherencia a las paredes celulares. En ese sentido, Barrios-Urdaneta y col. (2000) reportó mayor adherencia bacteriana a paredes celulares de paja a las 8 y 12 h de incubación en un medio suplementado con pectina comparado con medios suplementados con almidón o azúcares.

CONCLUSIONES

En términos generales, los diferentes concentrados provocaron efectos en el mismo sentido aumentando el volumen de gas y disminuyendo la velocidad de producción, aunque con rasgos particulares debidos a las características de sus fracciones químicas predominantes. La diferencia más importante se evidenció en el tiempo de latencia, separándose nítidamente los efectos de los concentrados almidonosos del efecto del fibroso. A pesar de que se necesitan más trabajos *in vivo* para una aproximación más completa del problema, podríamos afirmar que la suplementación con pulpa de citrus causaría los mismos efectos

a nivel ruminal y podría sustituir a los concentrados con alto contenido de almidón. Aunque la suplementación con pulpa de citrus no afecte la adherencia de los microorganismos en la misma medida que los cereales, deberían tomarse las mismas precauciones al momento de suministrarlos a los animales.

AGRADECIMIENTOS

A la directora y a los funcionarios del Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria por la colaboración prestada en el trabajo de campo. El trabajo fue financiado por ANII (FCE 2007_119).

REFERENCIAS

1. Ariza P., Bach A., Stern M.D., Hall M.B. (2001). Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J Anim Sci* 79:2713-2718.
2. Bampidis V.A., Robinson P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 128:175-217.
3. Barrios-Urdaneta A., Fondevila M., González-Ronquillo M., Castrillo C. (1997). Fermentación *in vitro* de forrajes lignocelulósicos suplementados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. *Arch Latinoam Prod Anim* 5(1):199-201.
4. Barrios-Urdaneta A., Fondevila M., Balcells J.,

- Dapoza C., Castrillo C. (2000) *In vitro* microbial digestion of straw cell wall polysaccharides in response to supplementation with different sources of carbohydrates. *Aust J Agric Res* 51(3): 393-400.
5. Barrios-Urdaneta, A., Fondevila, M., Castrillo, C., 2003. Effect of supplementation with different proportions of barley grain or citrus pulp on the digestive utilization of ammonia-treated straw by sheep. *Anim. Sci.* 76: 309-317.
6. Delahoy J.E., Muller L.D., Bargo F., Cassidy T.W., Holden L.A. (2003) Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86:906-915.
7. Dixon, R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust J Agric Res* 50:757-773.
8. Getachew G., Blümel M., Makaar H.P.S., Becker K. (1998) *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 72:261-281.
9. Lanzas C., Fox D.G., Pell A.N. (2007). Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim Feed Sci Technol* 136:265-280.
10. McAllister T.A., Bae H.D., Jones G.A., Cheng K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 72:3004-3018.
11. Moore J.E., Brant M.H., Kunkle W.E., Hopkins D.I. (1999). Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *J Anim Sci* 77:122-135.
12. Offner A., Bach A., Sauvant D. (2003). Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 106:81-93.
13. Robertson J.B., Van Soest P.J. (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker, New York, pp. 123-158.
14. 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. *Anim Feed Sci Technol* 48:185-197.
15. Williams B.A, Bosch M.W., Boer H., Verstegen M.W.A., Tamminga S. (2005) An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol* 123-124:445-462.