

Bromatological and fermentative characteristics *in vitro* of complements with *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb and *Cucurbita argyrosperma* Huber husk

Características bromatológicas y fermentativas *in vitro* de complementos con *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb y cáscara de *Cucurbita argyrosperma* Huber

Rojas-García, Adelaido R.¹; Orocio-Martínez, Rosa K.²; Sánchez-Santillán, Paulino^{1*}; Ayala-Monter, Marco A.¹; Maldonado-Peralta, María A.¹; Valenzuela-Lagarda, José L.³

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Universidad Autónoma de Guerrero. Cuajinicuilapa, Guerrero, México, C. P. 41940. ²Programa de Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Autónoma de Guerrero. Cuajinicuilapa, Guerrero, México, C. P. 41940. ³Centro Regional de Educación Superior. Universidad Autónoma de Guerrero. Cruz Grande, Guerrero, México, C. P. 41800.

*Autor para correspondencia: sanchezsantillanp@gmail.com

ABSTRACT

Objective: To determine the bromatological and *in vitro* fermentative characteristics of supplements made with pod parota and pipiana pumpkin pulp shell.

Methodology: The supplements evaluated were C1=50% pipiana pumpkin pulp shell and 50% pod parota; C2=60% pipiana pumpkin pulp shell and 40% pod parota; C3=70% pipiana pumpkin pulp shell and 30% pod parota. In the supplements, dry matter (DM), crude protein (CP), ash (As), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), partial and accumulated production of biogas and methane were determined, biogas production kinetics, pH, total bacteria count, ammoniacal nitrogen, degradation of DM and NDF.

Results: On average they quantified 15.88% of CP and 42.36% of NDF. C3 produced 4.53% more accumulated biogas than C2. In the accumulated production of methane C2 and C3 did not show differences; but, they produced 7.31% less methane than C1. *In vitro* degradations did not show differences between treatments.

Limitations on study: The best fermentative characteristics appear when the complement is worked with 60% pipiana pumpkin pulp shell.

Conclusions: Pipiana pumpkin pulp shell with pod parota are used to elaborate complements based on *in vitro* biogas production and degradations, so it can represent an alternative feeding of ruminants in the tropics.

Keywords: Biogas, *Cucurbita argyrosperma*, *Enterolobium cyclocarpum*, fermentation kinetics, methane.

RESUMEN

Objetivo: Determinar las características bromatológicas y fermentativas *in vitro* de complementos elaborados con harina de vaina de parota, cáscara y pulpa de calabaza pipiana.

Metodología: Se evaluaron los complementos C1=50% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 50% de harina de vaina de parota; C2=60% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 40% de harina de vaina de parota; C3=70% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 30% de harina de vaina de parota. En los complementos se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (Ce), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), producción parcial y acumulada de biogás y metano, cinética de producción de biogás, pH, conteo total de bacterias, nitrógeno amoniacal, degradación de MS y FDN.

Resultados: Los complementos tuvieron en promedio 15.88% de PC y 42.36% de FDN. C3 produjo 4.53% más biogás acumulado que C2. En la producción acumulada de metano C2 y C3 no mostraron diferencias; pero, produjeron 7.31% menos metano que C1. Las degradaciones *in vitro* no presentaron diferencias entre tratamientos.

Limitaciones del estudio: Las mejores características fermentativas se presentan cuando el complemento se elabora con 60% de harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana.

Conclusiones: La harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana con vaina de parota sirve para elaborar complementos con base en su producción de biogás y degradaciones *in vitro*, por lo que puede representar una alternativa de alimentación de rumiantes en el trópico.

Palabras clave: Biogás, cinética de fermentación, *Cucurbita argyrosperma*, *Enterolobium cyclocarpum*, metano.

poco lignificados, altamente digeribles y la semilla posee alto contenido de aminoácidos, a excepción de los azufrados, específicamente metionina y cisteína (Cecconello *et al.*, 2003), con un contenido de 19.50% de proteína cruda (Hernández-Morales *et al.*, 2018). Por tanto, el objetivo fue determinar las características bromatológicas y fermentativas *in vitro* de complementos elaborados con harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y vaina de parota.

MATERIALES Y MÉTODOS

La vaina de parota se recolectó en los campos de municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero en la primavera de 2017, por lo que se seleccionaron cuatro ramas al azar en cada árbol y se cosecharon todas las vainas fisiológicamente maduras; éstas se depositaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Nutrición Animal para su análisis (10 árboles para coleccionar las vainas). La cáscara con pulpa de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*) se molió en un molino mixto (M.A.GRO[®] TR-3500, México) con criba de 2.54 cm de diámetro y se deshidrató 5 d a 60 °C (Riossa[®] HCF-41, México) para obtener la harina. Tanto la vaina como la harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana se deshidrataron a 60 °C hasta peso constante y se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific[®], Swedesboro, NJ, USA).

Los complementos elaborados fueron: C1=50% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 50% de harina de vaina de parota; C2=60% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 40% de harina de vaina de parota; C3=70% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 30% de harina de vaina de

INTRODUCCIÓN

La alimentación de los rumiantes en el trópico se basa en el pastoreo, lo que condiciona la respuesta productiva de los animales a la calidad y cantidad del forraje disponible, por lo que la complementación alimenticia en el trópico es una estrategia para incrementar la producción de los animales y el uso de subproductos como complementos son una alternativa viable en el trópico (Guzmán *et al.*, 2012). El trópico se caracteriza por una diversidad climática y suelos con índices de enmendaduras variables, carentes de nutrimentos para la producción de forrajes de calidad nutricional que cubran los requerimientos de los rumiantes en pastoreo. Lo que genera una necesidad de suministrar complementos para lograr una buena transformación en productos como carne y leche (Rodríguez, 2011).

En el trópico hay especies arbóreas y arbustivas con potencial como alimento para el ganado (Delgado *et al.*, 2014), así también diferentes residuos de cultivos anuales que pueden usarse como el mango (Sánchez-Santillán *et al.*, 2019) y la cáscara con pulpa de calabaza (Lorenzo-Hernández *et al.*, 2019). La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*) produce flor, tallos jóvenes, frutos tiernos, frutos maduros y semillas (FAO, 2016). México es uno de los principales productores de calabaza en el mundo con un rendimiento promedio anual de 7.74 t·ha⁻¹ (Sánchez *et al.*, 2000). Los frutos maduros se emplean para elaborar dulces y como forraje para ganado y aves de corral (Halik *et al.*, 2014). Por otra parte, la vaina de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) es un producto palatable para rumiantes que contiene carbohidratos estructurales

parota. En el análisis bromatológico se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (Ce) y materia orgánica (MO) según AOAC (2007). Además, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con la metodología de Van Soest et al. (1991) usando ANKOM® Technology Method.

Producción de gas *in vitro*

Los componentes del medio contenía 30 mL de fluido ruminal clarificado [líquido ruminal bovino fresco centrifugado 10 min a 12,857 g y esterilizado (All American® 1941X, USA) 15 min a 121 °C y 15 psi], 5 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (J. T. Baker®) en 1 L de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (J. T. Baker®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Meyer®) + 1.6 g CaCl₂ 2H₂O (Meyer®) en 1 L de agua destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g de peptona de soya (MCDLab®), 0.1 g de extracto de levadura (BD Bioxon®), 4 mL de solución cisteína-sulfido [2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich®) a pH 10 con NaOH (Meyer®) + 2.5 g de Na₂S 9H₂O (Meyer®) en 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución a 8% de Na₂CO₃ (J. T. Baker®) y 50.6 mL de agua destilada. El medio se esterilizó 15 min en autoclave a 121 °C y 15 psi según la metodología de Cobos y Yokoyama (1995) modificada por Sánchez-Santillán et al. (2016) y Herrera-Pérez et al. (2018).

Un vial serológico de vidrio (120 mL) con 0.5 g de muestra y 45 mL de medio de cultivo se consideró un biodigestor. Los viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO₂, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (Ø 20 mm) y con un arillo de aluminio. Los biodigestores se esterilizaron 15 min a 121 °C y 15 psi, y se incubaron 24 h a 39 °C para verificar esterilidad (Herrera-Pérez et al., 2018). Los biodigestores se inocularon con 5 mL de bacterias ruminales totales obtenidas del fluido ruminal de una vaca Suiz-Bú; la vaca pastó en praderas de pasto pangola antes de tomar la muestra de fluido ruminal. El fluido ruminal se centrifugó por 3 min a 1,157 g para precipitar protozoarios y partículas de fibra (Torres-Salado et al., 2019).

La producción de biogás *in vitro* se midió mediante el desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale, Brasil) a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h. La producción de biogás se reportó como la producción parcial a las 24, 48 y 72 h; así como la producción acumulada a las 72 h de incubación (Texta et al., 2019). El biogás producido (en mL) se empleó para obtener los

parámetros de la cinética de producción de biogás: volumen máximo de biogás (V_m, mL g⁻¹), tasa de producción de biogás (S, h⁻¹) y tiempo lag (λ, h) del modelo logístico $V = V_m / (1 + \exp(2 - 4 * S * (T - \lambda)))$, descrito por Schofield y Pell (1995).

Para medir la producción de metano (CH₄) se usó una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G × 32mm) en los extremos, que se usaron para acoplar el biodigestor con un vial trampa de solución NaOH (2 N). El vial trampa se colocó de manera inversa en una probeta modificada que sirvió para coleccionar la solución NaOH (2 N) desplazada por el metano que se produce durante la incubación mediante una aguja hipodérmica colocada como válvula de salida. La producción de CH₄ se midió a las 24, 48 y 72 h (Almaraz-Buendía et al., 2019).

Características fermentativas

Al término de las 72 h de incubación, los biodigestores se utilizaron para medir y cuantificar las características fermentativas. El pH del medio de cultivo se midió con un potenciómetro (Hanna® HI2211, Italia; calibración pH 7 y 4). Una micropipeta (Corning®, USA) se usó para extraer 1 mL del medio contenido en el biodigestor en un tubo de ensayo (Pirex®) con 0.25 mL de formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich®). La cantidad de bacterias totales se calculó realizando el conteo directo en una cámara Petroff-Hausser (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA), con un área de 0.0025 mm² y profundidad de 0.02 mm. Para el recuento se usó un microscopio (BX31, Olympus, USA) a una magnificación de 1000 (Sánchez-Santillán et al., 2016).

Un mL del medio contenido en el biodigestor se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico (Meyer®) al 25% (proporción 4:1) y se centrifugó 25 min a 3,500 g y el sobrenadante se recuperó en viales de 2 mL. Un volumen de 20 μL de este sobrenadante se mezcló con 1 mL de solución fenol [10 mg de Na₂(NO)Fe(CN)₅·H₂O (Meyer®) + 10 g de cristales de fenol (Meyer®) aforado en 1 L de agua destilada] y 1 mL de solución hipoclorito de sodio [7.5 g de NaOH (Reasol®) + 21.3 g de Na₂HPO₄ (Meyer®) + 15 mL de hipoclorito de sodio a 5% (Reasol®) aforado a 1 L con agua destilada]. La mezcla se incubó 30 min a 37 °C en baño María. Posteriormente, 5 mL de agua destilada se adicionaron para diluir y se agitaron con un vórtex (Genie 2 G-560, USA). La absorbancia se midió a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway® 6850, USA) calibrado con un método (r²=0.9994) de

concentración de nitrógeno amoniacal según McCullough (1967).

En bolsas ANKOM[®] 541 con peso contante se filtró la muestra residual del biodigestor. Las bolsas con muestra se secaron 24 h a 60 °C en un horno de secado. La degradación de materia seca (DMS) se calculó con la fórmula $DMS (\%) = (muestra\ inicial - muestra\ residual / muestra\ inicial) * 100$ (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015; Hernández-Morales *et al.*, 2018). Las bolsas ANKOM[®] se sellaron con calor y se determinó el contenido de FDN (Van Soest *et al.*, 1991). El porcentaje de degradación de la FDN (% DFDN) se calculó con la fórmula $DFDN (\%) = (FDN\ inicial - FDN\ residual / FDN\ inicial) * 100$ (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

Análisis estadístico

Las variables de la composición bromatológica y de la técnica de producción de gas *in vitro* se analizaron en un diseño completamente al azar (4 repeticiones por complemento). Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS[®] (2011). Las diferencias de medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el trópico, la complementación de dietas basadas en gramíneas es necesaria para garantizar el suministro de nutrientes para rumiantes (Rodríguez *et al.*, 2014). Por lo que continuamente se buscan alternativas que puedan usarse en la alimentación de éstos. Las vainas de leguminosas arbustivas contienen arriba de 13% de PC y la calabaza contiene gran cantidad de carbohidratos solubles que pueden usarse en la alimentación de rumiantes. Así, los complementos elaborados con ha-

rina de calabaza pipiana y vaina de parota muestran un contenido promedio de 15.88% de PC y 43.54% de FDN (Cuadro 1), por lo que pueden considerarse como una alternativa para complementar la alimentación de los rumiantes en el trópico.

El contenido de PC en C3 disminuyó 10.63% respecto a C2 y C1. El contenido de FDN del C3 aumentó 17.6% respecto a C2 y C1. En ambos casos, la diferencia entre complementos es la sustitución de 10% de vaina de parota por harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana. La FDA aumentó conforme se disminuyó el contenido de vaina de parota, de modo que C2 aumentó 7.29% respecto a C1; mientras que, C3 aumentó 3.94% respecto a C2. El porcentaje de Ce en C2 fue 11.11% mayor que en C1, mientras que la MO fue 1% menor en C2 respecto a C1 (Cuadro 1).

Los complementos del presente estudio contienen mayor porcentaje de PC, FDN y FDA que complementos elaborados con 15% de harina de soya, 30% de harina de arroz, 15% de yuca, 30% de gallinaza, 5% de aceite de girasol usado y 5% de fermento de naranja (López-Varela, 2017). En contraste, los complementos del presente estudio presentaron menor porcentaje de PC y FDA y similar

concentración de FDN que un complemento para becerros elaborado con 50% de vaina de parota, 18.8% de heno de mulato II, 15.2% de pasta de soya, 4% de urea, 7% de maíz y 5% de mezcla mineral (Carbajal-Márquez *et al.*, 2019).

Por otra parte, la producción biogás *in vitro* sirve como indicativo de la disponibilidad de los carbohidratos durante la fermentación ruminal. La producción parcial de biogás de las 0 a las 24 h no mostró diferencia entre C2 y C3; sin embargo, estos complementos produjeron 45.77% más biogás que C1 (Cuadro 2). Esto indica que los complementos que contienen 60% (C2) y 70% (C3) de harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana contienen mayor disponibilidad de carbohidratos no estructurales; ya que durante las primeras 24 h se fermentan carbohidratos no estructurales en una fermentación *in vitro* (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015; Texta *et al.*, 2019).

La producción parcial de biogás del C2 de las 24 a 48 h, fue superior en 13.41% a C3; mientras que, C1 no mostró diferencias con C2 y C3. De las 48 a 72 h, C1 y C2 no presentaron diferencias en la producción de biogás; pero, produjeron 50% menos biogás que C3 (Cuadro 2). La producción parcial de biogás a

Cuadro 1. Análisis bromatológico de los complementos.

Complemento	PC (%)	FDN (%)	FDA (%)	Ce (%)	MO (%)
C1	16.6 a	40.9 b	24.1 b	7.6 c	92.4 a
C2	16.3 a	43.2 b	25.9 a	8.4 b	91.6 b
C3	14.8 b	46.5 a	26.9 a	8.9 a	91.1 c
EEM	0.28	0.85	0.39	0.17	0.17

Medias con letra distinta en cada columna, indican diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$). PC=proteína cruda; Ce=cenizas; MO=materia orgánica; FDN=fibra detergente neutro; FDA=fibra detergente ácido; EEM=error estándar de la media; C1=50% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 50% de harina de vaina de parota; C2=60% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 40% de harina de vaina de parota; C3=70% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 30% de harina de vaina de parota.

Cuadro 2. Variables de la producción de biogás *in vitro*.

Complemento		C1	C2	C3	EEM
Producción parcial de biogás (mL g ⁻¹ MS)	24 h	75.2 b	107.0 a	112.0 a	3.75
	48 h	51.3 ab	54.0 a	47.6 b	1.03
	72 h	21.3 b	23.7 b	33.9 a	1.30
Biogás acumulado		149.0 c	184.0 b	193.0 a	4.20
Producción parcial de metano (mL g ⁻¹ MS)	24 h	38.5 a	31.4 b	32.5 b	0.91
	48 h	12.4 b	15.4 a	14.4 ab	0.43
	72 h	4.97	4.98	4.97	0.003
Metano acumulado		56.2 a	53.4 b	51.4 b	0.59
Vm (mL g ⁻¹ MS)		143.0 b	178.0 a	182.0 a	3.78
S (h ⁻¹)		0.28 a	0.27 a	0.24 b	0.005
λ (h)		4.14 a	1.31 b	-1.89 c	0.56
pH		6.47 c	6.53 b	6.57 a	0.01
[B] (10 ⁹ células mL ⁻¹)		1.74	1.63	1.67	0.05
DMS (%)		77.6	77.7	74.6	0.74
DFDN (%)		54.9	52.6	51.21	1.48
N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)		9.00b	14.4a	11.9ab	0.85

Medias con letra distinta en cada fila, indican diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$). C1=50% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 50% de harina de vaina de parota; C2=60% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 40% de harina de vaina de parota; C3=70% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 30% de harina de vaina de parota; Vm=volumen máximo de biogás; S=tasa de producción de biogás; λ=tiempo lag; pH=potencial de hidrógeno; [B]=conteo de bacterias totales; DMS=degradación de materia seca; DFDN=degradación de fibra detergente neutro; N-NH₃=nitrógeno amoniacal; EEM=error estándar de la media.

partir de las 24 h indica indirectamente la fermentación de carbohidratos estructurales (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015, Texta *et al.*, 2019). De modo que, aunque C3 mostró mayor contenido de FDN (Cuadro 1) que los otros complementos, la producción de biogás de éste a las 72 h, indicó que su porcentaje de carbohidratos estructurales es mayormente fermentativo que los que componen a C1 y C2.

La producción acumulada de biogás muestra que conforme aumentó la proporción de cáscara con pulpa de calabaza pipiana se incrementó la producción de biogás. El complemento C2 produjo 24.15% mayor biogás que C1; y C3 produjo 4.53% más biogás que C2. Los complementos evaluados en el presente estudio muestran que la producción de biogás en las primeras 24 h representa entre 50.62 y 58.20% del total de biogás producido, infiriendo que la capacidad de fermentación de sus carbohidratos se basa en la alta digestibilidad de sus carbohidratos estructurales; dado que los forrajes tropicales con 56 d de rebrote de las 48 a 72 h muestran producciones de 10% del total de biogás producido (Almaraz-Buendía *et al.*, 2019), valor inferior a los observados en el presente estudio. Carbajal-Márquez *et al.* (2019) reportaron valo-

res similares al presente estudio en la producción acumulada de biogás en complementos proteicos para becerros con base en pasta de soya o vaina de parota, ya que registraron 184.86 y 198.51 mL g⁻¹ de MS en complementos que contenían 27.8% de pasta de soya y 50% de vaina de parota, respectivamente. Así mismo la producción acumulada de biogás del presente estudio es similar a la producción reportada en una dieta integral para bovinos que incluye 49% de maíz, 21% de heno de pangola, 5% de melaza de caña de azúcar, 11% de pasta de soya, 10% de vaina de moringa, 3% de mezcla mineral y 1% de urea (Rivera-Cristóbal *et al.*, 2019).

La producción parcial de metano (CH₄) de las 0 a las 24 h no presentó diferencias entre C2 y C3; sin embargo, éstos produjeron

20.58% menos CH₄ que C1. En la producción parcial de las 24 a las 48 h, C2 produjo 24.05% más CH₄ que C1. Además, de las 48 a las 72 h, la producción parcial de CH₄ no presentó diferencias entre complementos. Referente a la producción acumulada de CH₄, C2 y C3 no mostraron diferencias; pero, produjeron 7.31% menos CH₄ que C1 (Cuadro 2). La producción de CH₄ se puede deber a dos razones: 1) A los productos de fermentación de los carbohidratos estructurales entre lo que destacan CO₂ e H₂, los cuales son utilizados por las arqueas metanogénicas para la producción de CH₄ como parte de su ruta metabólica (Torres-Salado *et al.*, 2018, Torres-Salado *et al.*, 2019); 2) A una fermentación acetogénica de los carbohidratos disponibles durante la fermentación ruminal (Zavaleta, 1976). De modo que, se puede asumir que la producción de 31.09 a 38.24% del CH₄ producido en el presente estudio se deba a la fermentación de los carbohidratos estructurales en los complementos y el resto a una fermentación acetogénica de los carbohidratos no estructurales.

La producción de CH₄ parcial del C1 de las 0 a 24 h es similar, pero inferior en la producción acumulada de CH₄ a lo reportado por Carbajal-Márquez *et al.* (2019)

en complementos proteicos para becerros con base en pasta de soya y heno de mulato II. En comparación con el mismo autor, pero con un complemento que contiene 50% de vaina de parota, la producción acumulada de CH₄ en los complementos del presente estudio son inferiores, esto indica que la pérdida de energía vía CH₄ es menor en el presente estudio que los complementos proteicos para becerros que incluyen 50% de vaina de parota (Carbajal-Márquez *et al.*, 2019). El crecimiento bacteriano consta de la fase de retardo, fase de crecimiento exponencial, fase de estacionaria y fase de declinación (Tortora *et al.*, 2007); la cual puede interpretarse mediante la cinética de producción de biogás. Lo anterior, porque la variable tiempo lag (λ) representa el tiempo que requieren los microorganismos para adherirse al sustrato e iniciar el catabolismo (Schofield y Pell, 1995) lo que representa a la fase de retardo. La tasa de producción de biogás (S) indica la velocidad de fermentación del sustrato que puede compararse con la fase de crecimiento logarítmico. El volumen máximo (Vm) de biogás indica cuándo los microorganismos alcanzan su fase estacionaria.

El cálculo de las variables de la cinética de producción de biogás se obtiene mediante un modelo estadístico, por lo que se pueden presentar valores negativos que no tienen explicación biológica, como el caso del valor de λ para C3. Sin embargo, los valores de λ de los complementos en el presente estudio muestran que C1 tardó mayor tiempo en adherirse al sustrato. Además, disminuyó el valor de λ de los complementos conforme disminuyó la proporción de vaina de parota en los complementos (Cuadro 2). Esto

se puede asumir a que la vaina de parota contiene metabolitos secundarios como taninos y saponinas que interfieren en la adhesión de los microorganismos ruminales al sustrato (Delgado *et al.*, 2014).

Los complementos C2 y C3 no mostraron diferencias en volumen máximo de biogás, lo que puede indicar que los microorganismos alcanzaron su fase estacionaria al mismo tiempo, sin verse afectada por la composición de los complementos. Sin embargo, éstos tienen 25.80% mayor Vm que C1 (Cuadro 2). C1 y C2 mostraron 14.37% mayor S que C3 (Cuadro 2); de modo que los microorganismos inoculados en los biodigestores que contenían C1 y C2 como sustratos tuvieron mayor crecimiento microbiano. El pH del medio de cultivo del biodigestor mostró diferencias entre los complementos evaluados como sustratos; sin embargo, éste se mantuvo dentro del rango requerido para el desarrollo de los microorganismos ruminales y la variación se asume a los productos de fermentación (Cuadro 2; Kumar *et al.*, 2015). Además, estos valores de pH no inhiben la actividad celulolítica, ya que se requieren valores menores a 6 (Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016). La concentración de N-NH₃ del medio de cultivo fue 59.89% mayor en C2 que en C1; mientras que, C2 no presentó diferencias con C1 y C3 (Cuadro 2). Estos valores son resultado de la degradación de las fracciones nitrogenadas presente en los complementos, los cuales resultaron menores a lo requerido para alcanzar la mayor tasa de digestibilidad de la materia seca (Mehrez *et al.*, 1977). Valores superiores de N-NH₃ al presente estudio fueron reportados en complementos proteicos para becerros que incluyen

50% de vaina de parota (Carbajal-Márquez *et al.*, 2019). Las diferencias en la concentración de N-NH₃ mencionadas se asumen a que en el presente estudio los complementos promediaron 15.88% de PC, 76.32% menor concentración que la reportada en los complementos de Carbajal-Márquez *et al.* (2019). Sin embargo, aunque hubo diferencias en pH y N-NH₃ del medio de cultivo en los biodigestores usando los complementos evaluados en el presente estudio como sustratos, esto no se reflejó en la población de bacterias a las 72 h de fermentación; ya que el conteo total de bacterias promedió 1.68×10^9 células mL⁻¹ sin diferencias entre complementos, valores similares a los reportados en evaluaciones *in vitro* de forrajes tropicales usados como sustratos (Almaraz-Buendía *et al.*, 2019). Las degradaciones *in vitro* no presentaron diferencias entre complementos, promediando una DMS de 76.62% y 52.89% de DFDN. Los valores de DMS y DFDN del presente estudio se pueden relacionar con bajas concentraciones de fibras detergentes y predecir que no se afecta el consumo potencial de la materia seca en pruebas *in vivo* (Espinoza-Sánchez, 2019). Valores similares de DMS y superiores de DFDN fueron reportados en complementos proteicos para becerros que incluyen 50% de vaina de parota (Carbajal-Márquez *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Los niveles de degradación *in vitro* de la materia seca y de la fibra detergente neutro, producción de biogás y la cinética de fermentación de la harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana permiten inferir que contiene gran cantidad de carbohidratos fermentables para su uso como parte

de complementos para la alimentación de rumiantes en el trópico. Por lo que, el complemento que contiene 60% harina de cáscara con pulpa de calabaza pipiana y 40% de harina de vaina de parota reportó los mejores resultados bromatológicos y fermentativos *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Al Cuerpo Académico UAgro-CA-183 "Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico" por el financiamiento para la realización del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Almaraz-Buendía, I., García, A. M., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Bottini-Luzardo, M. B., & Rojas-García, A. R. (2019). Análisis bromatológico y producción de gas *in vitro* de forrajes utilizados en el trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 260-266.
- AOAC. (2007). *Official Methods of Analysis (18th Ed)* Association of official analytical chemist. Arlington, VA, USA.
- Carbajal-Márquez, U., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, A. R., Mendoza-Núñez, M. A., Ayala-Monter, M. A., & Hernández-Valenzuela, D. (2019). Fermentación *in vitro* de complementos para becerros con niveles crecientes de vaina de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 6(Sup. 2), 213-220.
- Cecconello, G., Benezra, M., & Obispo, N. (2003). Composición química y degradabilidad ruminal de los frutos de algunas especies forrajeras leñosas de un bosque seco tropical. *Zootecnia Tropical*, 21(2), 149-165.
- Cobos, M. A., & Yokoyama, M. T. (1995). *Clostridium paraputrificum* var. Ruminantium: Colonisation and degradation of shrimp carapaces. En *Workshop on Rumen Ecology Research Planning*. Simposio llevado a cabo en Addis Ababa, Ethiopia.
- Delgado, D. C., Hera, R., Cairo, J., & Orta, Y. (2014). Samanea saman, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(3), 205-212.
- Espinoza-Sánchez, J. (2019). Inclusión de mango maduro como fuente de energía en dietas para corderos criollos en el trópico seco (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Guerrero, Cuajinicuilapa, Guerrero.
- FAO. (2016). Cultivos desatendidos: 1492 desde una perspectiva diferente. Agricultura y protección del consumidor. Recuperado de www.fao.org/docrep/t0646e/T0646E09.htm#Cucurbita.
- Guzmán, O., Lemus, C., Martínez, S., Bonilla, J., Plasencia, A., & Ly, J. (2012). Características químicas del ensilado de residuos de mago (*Magnifera indica* L.) destinado a la alimentación animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46, 369-374.
- Halik, G. D., Lozicki, A., Koziorebska, A., Dymnicka, M., & Arkuszewska, E. (2014). Effect of ensiling pumpkin *Cucurbita maxima* with the addition of inoculant or without it on chemical composition and quality of silages. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Animal Science*, 53, 103-110.
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Reyes-Vázquez, I., & Mendoza-Núñez, M. A. (2018). Chemical composition and *in vitro* degradations of pods and leaves of legumes trees of Mexican dry tropic. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 105-120.
- Herrera-Pérez, J., Vélez-Regino, L. G., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Rojas-García, A. R., & Maldonado-Peralta, M. A. (2018). *In vitro* fermentation of fibrous substrates by water buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia. *MVZ Cordoba*, 23(3), 6860-6870.
- Kumar, C. P., Zeidan, M. S. A., Jena, R., Kumar, S., Singh, R., & Kumar A. P. (2015). *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi, India: Springer.
- López-Varela D. (2017). Caracterización bromatológica de pellets elaborados a partir de subproductos agropecuarios para la alimentación de bovinos. *Tecnología en Marcha, Especial Movilidad Estudiantil*, 4, 73-81.
- Lorenzo-Hernández, R., Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Herrera-Pérez, J., Mayrén-Mendoza, F. J., Salinas-Ríos, T., Rojas-García, A. R., & Maldonado-Peralta, M. A. (2019). Evaluación de las características de calidad y bromatológicas de ensilados elaborados con residuos de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 957-963.
- McCullough H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17(2), 297-304.
- Mehrez, A. Z., Orskov, E. R., & McDonald, I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition*, 38, 437-443.
- Rivera-Cristóbal, C., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Rafael Rojas-García, A., Maldonado-Peralta, M. A., & Herrera-Pérez, J. (2019). Producción *in vitro* de biogás, metano y degradación de materia seca de dietas que incluyen niveles crecientes de vaina de *Moringa oleifera*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 6(Sup. 2), 1320-1326.
- Rodríguez, R., González, N., Alonso, J., Domínguez, M., & Sarduy, L. (2014). Valor nutritivo de harinas de follaje de cuatro especies arbóreas tropicales para rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 371-378.
- Rodríguez, I. (2011). Estrategias de alimentación para bovinos en el trópico. *Mundo Pecuario*, 7(3), 167-170.
- Sánchez, M. A., Villanueva, C., Sahagún, J., & Channing, L. (2000). Variación genética y respuesta a la selección combinada en una variedad criolla de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6(2), 221-230.
- Sánchez-Santillán, P., & Cobos-Peralta, M. A. (2016). *In vitro* production of volatile fatty acids by reactivated cellulolytic bacteria and total ruminal bacteria in cellulosic substrate. *Agrociencia*, 50(5), 565-574.
- Sánchez-Santillán, P., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., Alvarado-Iglesias, A., Espinosa-Victoria, D., & Herrera-Haro, J. G. (2016). Use of activated carbon to preserve lyophilized cellulolytic bacteria. *Agrociencia*, 50(05), 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., Herrera-Pérez, J., Torres-Salado, N., Almaraz-Buendía, I., Reyes-Vázquez, I., Rojas-García, A. R., ... & Magadan-Olmedo, F. (2019). Chemical composition, and *in vitro* fermentation of ripe mango silage with molasses. *Agroforestry Systems*. doi: 10.1007/s10457-019-00442-z

- Sánchez-Santillán, P., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L., Santellano-Estrada, E., & Alarcón-Zúñiga, B. (2015). Fibrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius* - EUM1 in bagasse cane. MVZ Córdoba, 20, 4907-4916.
- SAS (2011). SAS/STAT Software. Versión 9.3. Cary, NC SAS, USA: SAS Institute INC.
- Scholfield, P., & Pell, A. N. (1995). Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. Journal of Animal Science, 73(11), 3455-3463.
- Texta, N. J., Sánchez-Santillán, P., Hernández, S. D., Torres-Salado, N., Crosby, G. M., Rojas-García, A. R., Herrera, P. J., & Maldonado, P. M. (2019). Use of disaccharides and activated carbon to preserve cellulolytic ruminal bacterial consortiums lyophilized. MVZ Cordoba, 24(3), 7305-7313.
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, A. R., Herrera-Pérez, J., & Hernández-Morales, J. (2018). Producción de gases efecto invernadero in vitro de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. Archivos de Zootecnia, 67(257), 55-59.
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, A. R., Almaraz-Buendía, I., Herrera-Pérez, J., Reyes-Vázquez, I., & Mayren-Mendoza, F. J. (2019). *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. Agrocienza, 53(02), 145-159.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología. Madrid, España: Medica Panamericana.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74(10), 3583-3597.
- Zavaleta, E. L. (1976). Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. Ciencia Veterinaria, 1, 223-240.

