





## Fermentación *in vitro* de un suplemento con niveles crecientes de vainas maduras de algarrobo (*Samanea saman*)

Brenda Karina Morales Campos<sup>1</sup>  , Paulino Sánchez Santillán<sup>2</sup>  , Nicolás Torres Salado<sup>2</sup>  ,  
Luis Alaniz Gutiérrez<sup>2</sup>  , Luis A. Saavedra Jiménez<sup>2</sup>;  , Liliana Aguilar Marcelino<sup>3</sup>  

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero,  
Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

### *In vitro* fermentation of a supplement with increasing levels of mature carob pods (*Samanea saman*)

**Abstract.** Tree legume pods, carob (*Samanea saman*) are characterized by their high protein content. The increase of protein in a supplement with tree legumes is an alternative to improve the productive parameters of ruminants. The objective was to evaluate *in vitro* biogas fermentation variables, kinetic estimators ( $A$ = biogas production potential,  $b$ = lag time or microbial efficiency and  $k$ = constant rate of biogas production of potentially degradable material), dry matter degradation (DMS) and detergent neutral fiber degradation (DFDN) of a supplement with 0, 10, 20 and 30% inclusion of mature carob pods. The bioreactor (120 mL serological vials) contained: 0.5 g of one type of supplement, 40 mL of culture medium and 10 mL of fresh rumen fluid (inoculum). The vials were incubated at 39 °C for 72 h. The experimental design was completely randomized. T20 presented higher biogas production at 12 and 24 h; whereas, at 48 and 72 h were T0 and T20. T20 was higher for  $A$ , T0 and T10 lower for  $k$  and T0 lower for  $b$  ( $p < 0.05$ ). pH and DMS showed no differences between treatments ( $p > 0.05$ ). The DFDN showed a tendency to decrease as the carob pod increased. It is concluded that the inclusion of 20% of mature carob pods in a supplement can be used as a feeding strategy in ruminants.

**Key words:** Tree legume, fermentation, kinetic estimators, DMS, DFDN, carob.

**Resumen.** Las vainas de leguminosas arbóreas, algarrobo (*Samanea saman*) se caracterizan por su alto contenido de proteína. El aumento de proteína en un suplemento mediante leguminosas arbóreas es una alternativa para mejorar los parámetros productivos de rumiantes. El objetivo fue evaluar las variables de la fermentación *in vitro* biogás, estimadores de cinética ( $A$ = potencial de producción de biogás,  $b$ = tiempo lag o eficiencia microbiana y  $k$ = tasa constante de producción de biogás del material potencialmente degradable), degradación de materia seca (DMS) y degradación de fibra detergente neutro (DFDN) de un suplemento con 0, 10, 20 y 30% de inclusión de vainas maduras de algarrobo. El bioreactor (viales serológicos de 120 mL) contenía: 0.5 g de un tipo de suplemento, 40 mL de medio de cultivo y 10 mL de fluido ruminal fresco (inóculo). Los viales se incubaron a 39 °C por 72 h. El diseño experimental fue un completamente al azar. T20 presentó mayor producción de biogás a 12 y 24 h; mientras, a las 48 y 72 h fueron T0 y T20. T20 fue mayor para  $A$ , T0 y T10 menores para  $k$  y T0 menor para  $b$  ( $p < 0.05$ ). pH y DMS no mostraron diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). LA DFDN mostró tendencia a disminuir conforme aumento la vaina de algarrobo. Se concluye, la inclusión de 20% de vaina madura de algarrobo en un suplemento, es posible utilizarse como una estrategia de alimentación en rumiantes.

**Palabras clave:** Leguminosa arbórea, fermentación, estimadores cinética, DMS, DFDN, algarrobo.

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: [15379627@uagro.mx](mailto:15379627@uagro.mx) Programa de Maestría en Producción de Bovinos en el Trópico-UAGro, 41940, Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2-UAGro, 41940, Cuajinicuilapa, Guerrero, México. <sup>3</sup>INIFAP-CENID-SAI, 62574, Jiutepec, Morelos, México.

## Fermentación *in vitro* de un suplemento con niveles crecientes de vagens maduras de alfarroba (*Samanea saman*)

**Resumo.** As vagens das leguminosas arbóreas, a alfarrobeira (*Samanea saman*) caracterizam-se pelo seu elevado teor proteico. O aumento de proteína em um suplemento por meio de leguminosas arbóreas é uma alternativa para melhorar os parâmetros produtivos de ruminantes. O objetivo foi avaliar as variáveis de fermentação *in vitro* do biogás, estimadores cinéticos ( $A$ = potencial de produção de biogás,  $b$ = lag time ou eficiência microbiana e  $k$ = taxa constante de produção de biogás de material potencialmente degradável), degradação da matéria seca (DMS) e degradação da fibra em detergente neutro (DFDN) de um suplemento com 0, 10, 20 e 30% de inclusão de alfarroba madura. O biodigestor (frascos sorológicos de 120 mL) continha: 0,5 g de um tipo de suplemento, 40 mL de meio de cultura e 10 mL de fluido ruminal fresco (inóculo). Os frascos foram incubados a 39 °C por 72 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. T20 apresentou maior produção de biogás em 12 e 24 h; enquanto, às 48 e 72 h, foram T0 e T20. T20 foi maior para  $A$ , T0 e T10 menores para  $k$  e T0 menor para  $b$  ( $p < 0,05$ ). O pH e o DMS não apresentaram diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). O DFDN mostrou uma tendência de diminuir à medida que a alfarrobeira aumentava. Conclui-se que a inclusão de 20% de alfarroba madura em um suplemento pode ser utilizada como estratégia alimentar em ruminantes.

**Palavras-chave:** Leguminosa arbórea, fermentação, estimadores cinéticos, DMS, DFDN, alfarroba.

### Introducción

Los sistemas de producción bovina en el trópico tienen una alimentación basada en pastoreo de forraje debido al buen rendimiento de biomasa, sin embargo, esta alimentación es afectada en la época de estiaje ya que afecta la disponibilidad, aunado a la baja calidad nutritiva ya que estos presentan un aporte de proteína cruda baja (7%) y un alto contenido de fibra (40%) de difícil digestión (Avila-Serrano *et al.*, 2020). Por tal motivo es necesario el aporte de proteína, energía y minerales a los microorganismos del rumen para ayudar a mejorar la digestibilidad de la fibra (Del valle, 2019). Durante la época de sequía los animales suelen alimentarse de residuos de la cosecha de maíz y sorgo o bien pastos que se reservaron de la temporada de lluvia, pero lo más sobresaliente es que se alimentan de frutos de árboles forrajeros (Olivares-Pérez *et al.*, 2011). Las vainas de leguminosas arbóreas se caracterizan por su alto

contenido de proteína, el aumento de proteína en un suplemento mediante leguminosas arbóreas es una alternativa para mejorar los parámetros productivos de ruminantes, aunado a que los costos de producción disminuyen (Delgado *et al.*, 2014). El árbol de algarrobo (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) es originario del trópico seco americano, brinda excelente sombra, madera y produce una gran cantidad de frutos. Las vainas de algarrobo al madurar se vuelven café, contienen una pulpa seca, oscura, dulce y con una alta calidad nutritiva. La maduración se produce entre febrero y mayo (Milián-Domínguez *et al.*, 2017). El contenido de PC es de 16.8%, FDN 34.37% y FDA 25.06% (Hernández-Morales *et al.*, 2018). El objetivo fue evaluar las variables de la fermentación *in vitro* de un suplemento con 0, 10, 20 y 30% de inclusión de vainas maduras de algarrobo.

### Materiales y Métodos

#### Lugar de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero (16° 28' N y 98° 11.27' O), se localiza a 46 msnm. La recolección de las vainas maduras de algarrobo se realizó en la localidad de Cuajinicuilapa, Guerrero, entre marzo y junio de 2022. Se seleccionaron al azar 8 árboles algarrobo que estuvieran produciendo vainas. La geoposición de los árboles se realizó utilizando un sistema de geoposición geográfica Google Earth (Versión 9.168.0.0) árbol 1 (16°28'34" N 98°25'44" W) árbol 2 (16°28'35" N 98°25'51" W) árbol 3 (16°28'24" N 98°25'32" W) árbol 4 (16°28'25" N

98°25'34" W) árbol 5 (16°27'58" N 98°25'01" W) árbol 6 (16°27'57" N 98°24'59" W) árbol 7 (16°28'28" N 98°24'39" W) y árbol 8 (16°28'27" N 98°24'39" W).

#### Suplementos

Las vainas maduras de algarrobo se molieron en un molino de martillo (M.A.GRO TR-3500). La melaza de caña de azúcar, urea, minerales, pasta de coco, pasta de soya y maíz se compraron a proveedores locales. Los suplementos proteicos (Cuadro 1) se elaboraron con niveles crecientes de vainas maduras de algarrobo (0, 10, 20, 30%).



**Cuadro 1.** Composición porcentual y química de un suplemento elaborado con niveles crecientes de vainas maduras de algarrobo

<b>Ingrediente (%)</b>	<b>T0</b>	<b>T10</b>	<b>T20</b>	<b>T30</b>
Melaza	20	20	20	20
Urea	2	2	2	2
Mineral	2	2	2	2
Vaina de algarrobo	0	10	20	30
Pasta de coco	27	27	22	28
Soya	21	19	19	15
Maíz	28	20	15	3
<b>Composición química (%)</b>				
MS	64.5	62.1	65.3	67.9
MO	90.7	91.0	91.8	90.4
PC	28.9	28.4	25.8	28.1
FDN	33.9	36.4	34.4	34.4
FDA	13.9	15.5	14.3	15.8
Ce	9.3	9.0	8.2	9.5

T0= 0% de vaina de algarrobo; T10= 10% de vaina; T20= 20% de vaina; T30= 30% de vaina; MS= materia seca; MO= materia orgánica; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; Ce= cenizas.

### Análisis químico

Para el análisis químico, los suplementos se deshidrataron en una estufa (Riossa® HCF-41, México) a 60 °C por 72 h. Posteriormente, los suplementos se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). Para determinar materia seca (MS) (método #967.03), proteína cruda (PC) se obtuvo mediante método de micro Kjeldahl (método # 920.105), la materia orgánica (MO) y cenizas (Ce) se estimaron por incineración en un horno mufla (método # 942.05) según AOAC (2005). La fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinaron usando soluciones y bolsas ANKOM (Van Soest *et al.*, 1994).

### Ensayo *in vitro*

Los componentes del medio de cultivo se prepararon según lo descrito por Sánchez-Santillán *et al.* (2020). El biodigestor (10 repeticiones) fue un vial serológico (120 mL) con 0.5 g de muestra de T0, T10, T20 y T30, 40 mL de medio de cultivo anaerobio (5% de solución mineral I, 5% de solución mineral II, 5% de solución buffer, 4% de solución reductora, 0.1% de resazurina a 0.1%, 50.9% de agua destilada y 30% de líquido ruminal clarificado) y 10 mL de fluido ruminal fresco. La elaboración de biodigestor fue bajo flujo de CO<sub>2</sub> para mantener condiciones de anaerobiosis. El fluido ruminal fresco se obtuvo de dos bovinos con cánula ruminal alimentados con pasto pangola y ensilado de mango; estos se manejaron de acuerdo con el reglamento interno de

bioética y bienestar animal de la Universidad Autónoma de Guerrero con fundamento en las normas oficiales NOM-062-ZOO-1999. Los biodigestores se colocaron en una incubadora (ECOSHEL 9082, México) a 39 °C durante 72 h.

### Producción de biogás

El biogás se midió a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 64, 72 h de incubación por desplazamiento de un émbolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale®, Brasil) y se reportó a las 12, 24, 48 y 72 h. Los estimadores de la cinética de producción de gas se determinó con el modelo de Gompertz:  $Y = A * \{ \exp [-b * \exp (-k * t)] \}$  donde Y = volumen de biogás en el tiempo t (mL g<sup>-1</sup> de MS), A = potencial de producción de biogás total cuando t=∞ (mL g<sup>-1</sup> de MS), k = tasa constante de producción de biogás del material potencialmente degradable (% h<sup>-1</sup>), b = tiempo lag o eficiencia microbiana (h), t = tiempo de incubación (Lavrenčič *et al.*, 1997). Los estimadores A, b y k se estimaron con un análisis de regresión no lineal, utilizando el procedimiento PROC NLMIXED de SAS (2011).

### Características fermentativas

Posterior a las 72 h de incubación se determinó: pH del medio (Hanna HI2211, Italia; calibración pH 7 y 4), degradación de la materia seca (DMS) y degradación de fibra detergente neutro (DFDN) por diferencia entre la cantidad inicial y residuo después de la fermentación (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

**Análisis estadístico**

Las variables obtenidas se analizaron en un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron con el

procedimiento PROC NL MIXED de SAS (2011). Los valores promedio se compararon con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

**Resultados**

El T20 presentó la mayor producción de biogás a las 12 y 24 h; a las 48 y 72 h de incubación, T0 y T20 mostraron la mayor producción de biogás ( $p < 0.05$ ). En contraste a las 72 h de incubación T10 y T30 mostraron la menor producción de biogás ( $p > 0.05$ ). En el estimador  $A$ , fue T20 el mayor valor ( $p < 0.05$ ); para  $k$  los menores valores

fue T0 y T10 y para  $b$  el menor fue T0 ( $p < 0.05$ ). Las variables de pH y DMS no mostraron diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). LA DFDN muestra una tendencia a disminuir conforme se aumenta la vaina de algarrobo al suplemento (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Variables de la prueba *in vitro* de un suplemento con niveles crecientes de vainas maduras de algarrobo

Variable	T0	T10	T20	T30
Biogás 12 h (mL g <sup>-1</sup> MS)	125.3 <sup>b</sup>	125.3 <sup>b</sup>	152.7 <sup>a</sup>	137.3 <sup>b</sup>
Biogás 24 h (mL g <sup>-1</sup> MS)	194.3 <sup>b</sup>	191.8 <sup>b</sup>	217.7 <sup>a</sup>	189.4 <sup>b</sup>
Biogás 48 h (mL g <sup>-1</sup> MS)	242.5 <sup>ab</sup>	236.8 <sup>b</sup>	256.3 <sup>a</sup>	228.4 <sup>b</sup>
Biogás 72 h (mL g <sup>-1</sup> MS)	263.4 <sup>ab</sup>	252.9 <sup>cb</sup>	273.2 <sup>a</sup>	246.3 <sup>c</sup>
$A$ (mL g <sup>-1</sup> de MS)	251.04 <sup>ab</sup>	243.63 <sup>cb</sup>	260.58 <sup>a</sup>	233.50 <sup>c</sup>
$k$ (h)	0.10 <sup>c</sup>	0.10 <sup>cb</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.11 <sup>ab</sup>
$b$ (% h <sup>-1</sup> )	2.45 <sup>c</sup>	2.35 <sup>b</sup>	2.22 <sup>ab</sup>	2.00 <sup>a</sup>
pH	6.5	6.5	6.5	6.6
DMS (g Kg <sup>-1</sup> MS)	75.06	72.53	69.25	67.00
DFDN (g Kg <sup>-1</sup> MS)	56.80 <sup>a</sup>	53.51 <sup>a</sup>	47.26 <sup>ab</sup>	37.53 <sup>b</sup>

**Discusión**

La producción de biogás del T20 en las primeras 24 h, se asume a una mayor disponibilidad de carbohidratos solubles (Sánchez-Santillán *et al.*, 2020); mientras que la disponibilidad de carbohidratos estructurales fermentables fue mayor para T0 y T20, por su producción de biogás a las 48 h y 72 h (Sánchez-Santillán *et al.*, 2020). Sin embargo, Carbajal-Márquez *et al.* (2019) reportaron valores inferiores de producción de biogás a las 24 h (137.25 mL g<sup>-1</sup> MS), 48 h (27.51 mL g<sup>-1</sup> MS) y 72 h (10.96%) en suplemento con 4% urea, 7% maíz, 5% sal mineral, 25% vaina de parota, 37.7% heno y 21.5% soya. Sánchez-Santillán *et al.* (2020) informaron valores bajos en el estimador  $A$  (163.9 mL g<sup>-1</sup> de MS), similares en  $b$  (0.10 mL h<sup>-1</sup>) y altos en  $k$  (2.83 h) en una dieta que contenía 63% de maíz molido, 11% de pasta de soya, 20% *Crotalaria* 30 días de rebrote, 3% hierba estrella, 1% urea y 2% mezcla mineral, comparados con los datos

obtenidos en el presente estudio (Cuadro 2). El pH se mantuvo entre 6.5 y 6.6, valores que se encuentran dentro del rango de pH ruminal, el cual va de 5.5 a 6.9 (Choudhury *et al.*, 2015); ya que se usó una solución buffer para mantener el rango de pH.

La DMS está sobre 60%, lo que se relaciona con fracciones bajas de fibras detergentes (Hernández-Morales *et al.*, 2018). Orocio *et al.* (2017) reportaron valores superiores de DMS 77.58% en un suplemento que contenía 50% de harina de *Cucurbita anguiculata* y 50% de vaina de *Enterolobium cyclocarpum*. La DFDN de los tratamientos disminuyó conforme aumento la inclusión de la vaina de algarrobo; esto puede estar ligado a metabolitos secundarios como taninos, ya que intervinieron negativamente en la digestibilidad de los nutrientes (Van Soes, 1994).

**Conclusiones**

La inclusión de 20% de vaina madura de algarrobo en un

suplemento, es posible utilizarse como una estrategia de alimentación en rumiantes.

**Agradecimientos**

Al Cuerpo Académico “Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico” y al equipo de laboratorio de nutrición animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero, México.



**Conflicto de intereses:** Los autores manifiestan que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

### Literatura Citada

- AOAC 2005. Official methods of vanalysis, 18th edn. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- Avila-Serrano, NY, SJ López-Garrido, MM Galicia-Jiménez, GJ González-Crespo y MA Camacho-Escobar. 2020. Efecto de la incorporación de arbóreas a dietas de *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal *in vitro*. *Terra Latinoamericana*, 38(2): 403-412.
- Carbajal-Márquez, U, P Sánchez-Santillán, AR Rojas-García, MA Mendoza-Núñez, M Ayala-Monter, M y D Hernández-Valenzuela. 2019. Fermentación *in vitro* de complementos para becerros con niveles crecientes de vaina de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 6(2):213-220.
- Choudhury, PK, ZM Salem, R Jena, S Kumar, R Singh, AK Puniya. 2015. Rumen Microbiology: An Overview. En Puniya AK; Singh R; Kamra DN (Editor.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* Springer. India. pp. 3-16.
- Del Valle, RJ. 2019. Que es un bloque multi-nutricionales. Elaboración de bloques multinutricionales como alternativa alimenticia para bovinos en épocas de sequía. *Sennova*, 15-17.
- Delgado, C, R Hera, J Cairo y Y Orta. 2014. *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(3): 205-212.
- Hernández-Morales, J, P Sánchez-Santillán, N Torres-Salado, J Herrera-Pérez, AR Rojas-García, I Reyes-Vázquez y MA Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1):105-120.
- Lavrenčič, A, B Stefanon y P Susmel. 1997. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science Journal*, 64:423-431.
- Milián-Domínguez, JC, O Iglesias-Monroy, H Valdés-Márquez y Y Sanjudo-Ramos. 2017. Estudio fitoquímico integral del *Samanea saman* de la región occidental de Cuba. *Revista Cubana de Química*, 29(3):480-491.
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Olivares-Pérez, J, F Avilés-Nova, B Albarrán-Portillo, S Rojas-Hernández y OA Castelán-Ortega. 2011. Identificación, usos y medición de leguminosas arbóreas forrajeras en ranchos ganaderos del sur del Estado de México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2):739-748.
- Orocio, RK, P Sánchez, N Torres, J Herrera, AR Rojas, MB Bottini y MA Mendoza. 2017. Gas acumulado y degradaciones *in vitro* de un suplemento con base en harina de *Cucurbita argyrosperma* y vaina de *Enterolobium cyclocarpum*. *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*, 1(1):311-313.
- Sánchez-Santillán, P, J Herrera-Pérez, N Torres-Salado, I Almaraz-Buendía, I Reyes-Vázquez, AR Rojas, M Gómez-Trinidad, EO Contreras-Ramírez, MA Maldonado-Peralta y F Magadán-Olmedo. 2020. Composición química y fermentación *in vitro* del ensilaje de mango maduro con melaza, *Sistemas Agroforestales*, 94:1511-1519.
- SAS Institute Inc 2011. *Statistical Analysis System, SAS, User's Guide*. SAS Inst., Cary, NC
- Van Soest, PJ, B Robertson and A Lewis. 1994. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.

