

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**POSGRADO CONJUNTO EN CIENCIA ANIMAL**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EFFECTO DEL INÓCULO (LÍQUIDO RUMINAL O EXCRETAS) SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE GAS Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES *in vitro* DE  
ALIMENTOS PARA OVINOS**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**Ing. SEBASTIAN SÁENZ BARRERA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**GRAL. ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

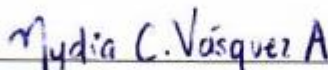
**JUNIO 2023**

**EFFECTO DEL INÓCULO (LÍQUIDO RUMINAL O EXCRETAS) SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE GAS Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES *in vitro* DE  
ALIMENTOS PARA OVINOS**

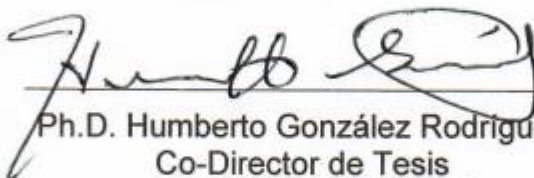
Aprobación de Tesis por el Comité Particular de  
Sebastian Sáenz Barrera



Dr. sc. agr. Hugo Bernal Barragán  
Director de Tesis



Dra. Nydia Corina Vásquez Aguilar  
Co-Directora de Tesis



Ph.D. Humberto González Rodríguez  
Co-Director de Tesis



Dr. Oscar Daniel García Pérez  
Co-Director de Tesis



Dr. Arquímedes Cruz López  
Co-Director de Tesis



Dr. Uziel Castillo Velázquez  
Coordinador de Posgrado en Conjunto en Ciencia Animal

## DEDICATORIA

A:

Primeramente a Dios y la virgen que me han acompañado durante toda mi vida, guiándome y ayudándome a ser una persona de bien.

Con todo mi amor, cariño y afecto a mi madre Teresita de Jesús Barrera Valdez y mi padre Salvador Sáenz García, que con su sacrificio han hecho que mi formación profesional sea posible. Sus valores y enseñanzas los llevare a donde quiera que vaya.

A mis abuelitas, Rosa Elia Valdez González y Elda Esther García Barrera, que han estado para mí desde que tengo memoria.

A mis hermanos Christian y Gustavo que a pesar que nos encontremos lejos, siempre serán mis mejores amigos durante toda mi vida.

Al resto de mi familia, que siempre estuvieron pendientes de mí.

A Yoselin, que me ha acompañado durante una gran etapa de mi vida, siempre estando para mí, Te amo intensamente.

Al Dr. Hugo Bernal Barragán y la Dra. Nydia C. Vásquez Aguilar, los cuales considero mis mentores profesionales y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado Conjunto en Ciencia Animal de Facultad de Agronomía y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, por su apoyo y atención durante toda mi etapa de estudio.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la Beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencia Animal.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la UANL.

Al Dr. Hugo Bernal Barragán, siendo mi director de tesis, al cual le agradezco estar pendiente de mí durante la licenciatura, por acordarse de mí en los inicios de este trabajo y por brindarme esa confianza, conocimientos, tiempo y esfuerzo, para concluir de buena manera esta etapa profesional. ¡Muchas gracias doctor!

A la Dra. Nydia C. Vásquez Aguilar, por su apoyo, consejos, conocimientos y esa bondad de escuchar. Además de hacer grato el tiempo en el laboratorio con su buen humor y organización. ¡Muchas gracias doctora!

Al Dr. Arquímedes Cruz López, por sus conocimientos, tiempo, confianza y apoyo en sus gratas instalaciones.

Al Dr. Humberto González Rodríguez, por sus opiniones acertadas, equipos y estar siempre pendiente del trabajo.

Al Dr. Oscar Daniel García Pérez, por fungir como MVZ encargado de los animales de experimentación y su acertada retroalimentación.

A mis maestros, durante toda la etapa de la maestría, por sus observaciones, conocimientos y tiempo brindado para mis dudas.

A la Ing. Estefanía, compañera y amiga, gracias por escucharme, por tu humor y por el tiempo que pasamos en el laboratorio y durante la atención de los animales.

A la Ing. Valeria, encargada del Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos y amiga, por tu disposición y amabilidad, para ayudar en aspectos relacionados a este trabajo.

A la M.C. Judith y amiga, por escucharme, por tu ayuda y el tiempo que compartimos en el laboratorio.

Al M.C. y M.V.Z. Carlos y amigo, por tu ayuda, humor y el tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A todas las muchachas y muchachos de servicio social, verano de investigación o de la materia de investigación, Litzy, Dafne, Rebeca, Bárbara, Martha, Abril, Esteban, Felipe, Meli y Yusay, que participaron para concluir este trabajo. ¡Gracias!

A mis compañeras, Janeth, Perla y Samantha por compartirme sus dudas y problemas, además de mantenerme al tanto de los pendientes durante la maestría. Espero les vaya muy bien en su siguiente etapa.

A Alfonso, José Luis, Agundis y todos mis amigos, por su tiempo al escucharme.

A los animales de experimentación, con los cuales, nada de este trabajo fuera posible gracias “morado” y “rorro”.

Y finalmente, gracias a mí, por creer en mí mismo, y dejar a un lado las inseguridades que me han perseguido. Espero se refleje en este trabajo mi compromiso y el gusto que mantengo en este ámbito profesional.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
Índice	v
Índice de figuras	vii
Índice de cuadros	viii
Lista de símbolos y abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	3
2.1 Alimentación en ovinos	3
2.1.1 Consumo de materia seca	6
2.1.2 Digestibilidad	7
2.1.3 Energía de mantenimiento	8
2.1.4 Energía para crecimiento	11
2.1.5 Energía para gestación	13
2.1.6 Energía para lactancia	14
2.1.7 Proteína para mantenimiento	15
2.1.8 Proteína de mantenimiento para ovejas no lactantes	16
2.1.9 Proteína para crecimiento	16
2.1.10 Proteína para lactancia	17
2.1.11 Proteína para gestación	18
2.1.12 Minerales	18
2.1.13 Vitaminas	20
2.2 Evaluación de los alimentos respecto a la tasa de utilización de nutrientes y energía	20
2.2.1 Métodos <i>in vivo</i> e <i>in situ</i>	20
2.3 Producción de gas <i>in vitro</i>	22
2.4 Inóculos en PGIV	25
2.4.1 Inóculo de líquido ruminal	25
2.4.2 Inóculo de excretas	26
2.4.3 Inóculos enzimáticos	28
2.5 Ácidos grasos volátiles	29
2.5.1 Acetato	31
2.5.2 Propionato	32
2.5.3 Butirato	32
2.6 Justificación	34
2.6.1 Planteamiento del problema	35
2.6.2 Hipótesis	35
2.6.3 Objetivo general	35
2.5.4 Objetivos específicos	35
3 Materiales y métodos	36
3.1 Animales donadores de inóculo	36
3.2 Dietas experimentales	36
3.3 Planteamiento experimental	37

<b>3.4</b>	Composición química de las dietas experimentales	<b>37</b>
<b>3.4.1</b>	Humedad	<b>38</b>
<b>3.4.2</b>	Cenizas	<b>38</b>
<b>3.4.3</b>	Grasa	<b>39</b>
<b>3.4.4</b>	Fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina ácido detergente	<b>39</b>
<b>3.4.5</b>	Proteína cruda	<b>40</b>
<b>3.5</b>	Determinación de la producción de gas <i>in vitro</i>	<b>41</b>
<b>3.6</b>	Modelos de regresión lineal simple y regresión polinómica	<b>42</b>
<b>3.7</b>	Modelo Gompertz	<b>43</b>
<b>3.8</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica	<b>43</b>
<b>3.9</b>	Contenido de energía metabolizable	<b>44</b>
<b>3.10</b>	Determinación de la cantidad de ácidos grasos volátiles	<b>45</b>
<b>3.11</b>	Determinación de la proporción de ácidos grasos volátiles	<b>45</b>
<b>3.12</b>	Análisis estadístico	<b>46</b>
<b>4</b>	Resultados	<b>47</b>
<b>4.1</b>	Composición química de las dietas experimentales	<b>47</b>
<b>4.2</b>	Producción de gas <i>in vitro</i>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	Energía metabolizable	<b>52</b>
<b>4.4</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica	<b>52</b>
<b>4.5</b>	Producción de gas <i>in vitro</i> ajustada con modelo Gompertz	<b>54</b>
<b>4.6</b>	Energía metabolizable a partir de PGIV con Gompertz	<b>57</b>
<b>4.7</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica a partir de PGIV con Gompertz	<b>58</b>
<b>4.8</b>	Ácidos grasos volátiles	<b>59</b>
<b>5</b>	Discusión	<b>62</b>
<b>5.1</b>	Producción de gas <i>in vitro</i>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	Efecto de la levadura inactivada	<b>64</b>
<b>5.3</b>	Ecuaciones de predicción	<b>65</b>
<b>5.4</b>	Energía metabolizable y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica	<b>65</b>
<b>5.5</b>	Ácidos grasos volátiles	<b>66</b>
<b>6</b>	Conclusiones	<b>68</b>
<b>7</b>	Revisión bibliográfica	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Pistón-jeringas (P) en un rotor (R), moviéndose por motor eléctrico (M), en horno de secado (D) a $39 \pm ^\circ\text{C}$ .	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Distribución de la composición taxonómica de líquido ruminal y excretas a nivel filo. Eje x representa las muestras a partir de excretas o líquido ruminal de vacas en alta producción. El eje y representa la abundancia relativa (%) de cada filo.	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Síntesis de ácidos grasos volátiles y su transporte hacia el hígado.	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> Participación del acetato en la lipogénesis.	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Vía metabólica del propionato.	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Metabolismo de butirato.	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> PGIV a 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h de incubación en dietas con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F). A) Inóculo de líquido ruminal. B) Inóculo de excretas con levadura.	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Producción de gas <i>in vitro</i> (PGIV) a 24 h utilizando líquido ruminal o excretas con levadura como inóculos, y estimaciones de PGIV utilizando un modelo regresión lineal simple (RLS) o un modelo polinómico (RPOL) o un factor de corrección (FC), calculados a partir de la producción de gas de excretas con levadura para cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C).	<b>51</b>
<b>Figura 9.</b> PGIV a 3, 6, 9, 12 y 24 de incubación, en dietas con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F), ajustado con el modelo de Gompertz. A) Inóculo de líquido ruminal. B) Inóculo de excretas con levadura.	<b>54</b>
<b>Figura 10.</b> Producción de gas <i>in vitro</i> (PGIV) a 24 h utilizando líquido ruminal (barra verde) y las estimaciones de PGIV utilizando excretas con levadura como inóculos, y un modelo regresión lineal simple (RLS) o un modelo polinómico (RPOL) o un factor de corrección (FC), generados en el presente estudio.	<b>57</b>
<b>Figura 11</b> Curvas de Calibración para AGV's. A) Curva estándar de acético. B) Curva estándar de propiónico. C) Curva estándar de butírico.	<b>59</b>
<b>Figura 12</b> Concentración de ácidos grasos volátiles total en cada inóculo evaluado.	<b>60</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Producción de ovinos en México en 2021.	<b>4</b>
<b>Cuadro 2.</b> Requerimientos energéticos de actividades físicas en ovinos de 50 kg.	<b>9</b>
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos y proporciones de concentrado (C) y forraje (F) a evaluar.	<b>37</b>
<b>Cuadro 4.</b> Composición química de las dietas.	<b>47</b>
<b>Cuadro 5.</b> Producción de gas <i>in vitro</i> (PGIV) al utilizar líquido ruminal a las 24 h y excretas con levadura a las 24, 36 y 48 h como inóculos.	<b>49</b>
<b>Cuadro 6.</b> Modelos predictivos de PGIV de líquido ruminal (y) a partir de PGIV de excretas con levadura (x).	<b>50</b>
<b>Cuadro 7.</b> Estimación del contenido de energía metabolizable (Mcal/kg), utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h.	<b>52</b>
<b>Cuadro 8.</b> Estimación del contenido de digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (%), utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h.	<b>53</b>
<b>Cuadro 9.</b> Producción de gas <i>in vitro</i> (PGIV), ajustado con el modelo de Gompertz al utilizar líquido ruminal y excretas con levadura a las 24 h, como inóculos.	<b>55</b>
<b>Cuadro 10.</b> Modelos predictivos de PGIV de líquido ruminal a las 24 h (y) a partir de PGIV de excretas con levadura a las 24 h (x).	<b>56</b>
<b>Cuadro 11.</b> Contenido de energía metabolizable (Mcal/kg), calculado valores de PGIV estimadas con ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) para cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, y con líquido ruminal a las 24 h.	<b>58</b>
<b>Cuadro 12.</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (DIVMO, %), obtenida utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas	<b>58</b>

<b>Cuadro 13</b>	en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h. Proporción de AGV's en líquido ruminal y excretas con levadura como inóculos, en cinco dietas contrastantes de C y F, a las 24 horas.	<b>61</b>
------------------	--	-----------

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>AGV's</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>C</b>	Concentrado
<b>CEG</b>	Contenido de energía para ganancia
<b>CEM</b>	Consumo de energía metabolizable
<b>Cen</b>	Cenizas
<b>CGL</b>	Contenido de grasa en la leche
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros cuadrados
<b>CMS</b>	Consumo de materia seca
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CPvL</b>	Contenido de proteína verdadera de la leche
<b>DIVMO</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
<b>EE</b>	Extracto etéreo
<b>EM</b>	Energía metabolizable
<b>EMdc</b>	Energía metabolizable disponible para crecimiento
<b>EMdc</b>	Energía metabolizable disponible para crecimiento
<b>EMrg</b>	Energía metabolizable requerida para gestación
<b>EMrl</b>	Energía metabolizable requerida para lactancia
<b>EMrm</b>	Energía metabolizable requerida para mantenimiento
<b>EN</b>	Energía Neta
<b>ENrg</b>	Energía neta requerida para gestación
<b>ENrl</b>	Energía neta requerida para lactación
<b>ENrm</b>	Energía neta requerida para mantenimiento
<b>ENrm<sub>Act</sub></b>	Energía neta requerida para mantenimiento debido a actividad física
<b>ENrm<sub>basal</sub></b>	Energía neta requerida para mantenimiento basal
<b>ENrm<sub>Ef</sub></b>	Energía neta requerida para mantenimiento en estrés por frío
<b>ENrm<sub>Urea</sub></b>	Energía neta para el mantenimiento del ciclo de la urea.
<b>ER<sub>Grasa</sub></b>	Energía retenida para grasa
<b>ER<sub>Prot</sub></b>	Energía retenida como proteína
<b>EVG</b>	Contenido de energía para ganancia
<b>F</b>	Forraje
<b>FBW</b>	Peso corporal completo
<b>FC</b>	Factor de corrección
<b>FDA</b>	Fibra detergente Acido
<b>FDN</b>	Fibra detergente neutro
<b>gal</b>	Galón
<b>GEG</b>	Grasa en la ganancia
<b>GPV</b>	Ganancia de peso vacío
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>kcal</b>	Kilocalorías
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>kg</b>	Constante de la eficiencia parcial de la utilización de energía metabolizable para energía neta de crecimiento.

<b>kJ</b>	Kilojulios
<b>k<sub>m</sub></b>	Constante de la eficiencia parcial de la utilización de energía metabolizable para energía neta de mantenimiento.
<b>L</b>	Consumo sobre el factor de requerimientos de energía para mantenimiento
<b>LAD</b>	Lignina detergente acido
<b>lb</b>	Libra
<b>Mcal</b>	Megacalorías
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Materia seca
<b>P</b>	Grado de madurez
<b>PC</b>	Proteína cruda
<b>PCA</b>	Peso corporal del animal
<b>PCN</b>	Peso del cordero al nacer
<b>PCV</b>	Peso corporal vacío
<b>PEG</b>	Proteína en la ganancia
<b>PGD</b>	Promedio de ganancia diaria
<b>PGD<sub>UT</sub></b>	Promedio de ganancia diaria del útero
<b>PGIV</b>	Producción de gas <i>in vitro</i>
<b>PMg</b>	Proteína metabolizable para ganancia
<b>PMm</b>	Proteína metabolizable para mantenimiento
<b>PMrc</b>	Proteína metabolizable requerida para crecimiento
<b>PMrg</b>	Proteína metabolizable requerida para gestación
<b>PMrl</b>	Proteína metabolizable requerida para lactancia
<b>PMrm</b>	Requerimientos proteicos para mantenimiento
<b>PNg</b>	Proteína neta de ganancia
<b>PNrc</b>	Proteína neta requerida para crecimiento
<b>PNrg</b>	Proteína neta requerida para gestación
<b>PNrl</b>	Proteína neta requerida para lactación
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PUG</b>	Peso del útero en gestación
<b>R</b>	Ajuste para ganancia o perdida
<b>RL</b>	Rendimiento de leche
<b>RLS</b>	Regresión lineal simple
<b>RNS</b>	Sistema de nutrientes para rumiantes
<b>RPOL</b>	Regresión polinómica
<b>TDN</b>	Nutrientes totales digestibles

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de explorar y evaluar la sustitución del líquido ruminal (T1), como inóculo en la técnica de producción de gas *in vitro*, con excretas adicionadas con levadura (T2) para determinar el valor nutricional de cinco tipos representativos de dietas para ovinos. Inóculos obtenidos de dos ovinos Saint Croix provistos con fístula ruminal, fueron utilizados para determinar la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 horas de alimentos con proporciones de concentrado (C) y forraje (F), de 100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F, 0C:100F, incubados (n=3) por duplicado en jeringas graduadas a 100 ml. El contenido de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas de cada dieta experimental se determinó por duplicado mediante los procedimientos de la AOAC (2005), por su parte el contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina ácido detergente (LAD) fueron determinados por el método de Van Soest y Robinson (1991). Los resultados de la composición química se analizaron mediante un modelo completamente al azar. La producción de gas *in vitro* (PGIV), la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) y el contenido de energía metabolizable (EM), se determinaron mediante la metodología propuesta por Menke y Steingass (1988). La concentración y proporción de ácidos grasos volátiles (AGV's) se obtuvo por cromatografía de gases, según lo descrito por Reyna-Gómez *et al.* (2021). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza con un arreglo factorial 2 x 5 (dos inóculos y cinco dietas) para las variables relacionadas a la tasa de utilización de los dos inóculos en cada uno de los cinco alimentos evaluados. La PGIV determinada utilizando líquido ruminal, fue mayor que la registrada al utilizar excretas con levadura como inóculo en cada dieta evaluada. A partir de los resultados de producción de gas obtenidos en la presente investigación, se desarrollaron mediante regresión lineal simple (RLS), y con regresión polinómica (RPOL) ecuaciones que permitieron estimar adecuadamente la PGIV del líquido ruminal, así como los resultados de Energía Metabolizable y Digestibilidad de la Materia Orgánica, a partir de la PGIV de excretas con levadura como inóculo alternativo. En conclusión, las excretas con levadura pueden ser utilizadas como inóculo para estimar la PGIV que permita determinar el valor nutritivo del alimento.

## ABSTRACT

The present work was carried out with the purpose of exploring and evaluating the substitution of rumen liquid (T1), as inoculum for the *in vitro* gas production technique, with yeast-added excreta (T2), to determine the nutritional value of five representative diets for sheep. Inocula obtained from two Saint Croix sheep provided with ruminal fistula, were utilized to determine gas production at 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 hours of feed with concentrate (C) and forage (F) proportions of 100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F, 0C:100F, incubated (n=3) by duplicate in graduated syringes at 100 mL (n=3). For each experimental diet, crude protein (CP), ether extract (EE) and ash contents were determined in duplicate for each experimental diet using AOAC (2005) procedures. Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents were determined by the method of Van Soest and Robinson (1991). Chemical composition results were analyzed using a completely randomized model. *In vitro* gas production (IVGP), *in vitro* digestibility of organic matter (IVOMD) and metabolizable energy content (ME) were determined by the methodology proposed by Menke and Steingass (1988). The concentration and proportion of volatile fatty acids (VFA's) was obtained by gas chromatography, as described by Reyna-Gómez *et al.* (2021). Results of the variables obtained were analyzed by analysis of variance with a 2 x 5 factorial arrangement (two inocula and five diets). The IVGP determined using rumen liquid was higher than that recorded when using yeast excreta as inoculum in each diet evaluated. Based on the results for gas production, equations were developed by simple linear regression (SLR), and polynomial regression (POLR), which estimated rumen liquid IVGP, as well as Metabolizable Energy Content and Organic Matter Digestibility using IVGP from incubations with yeast-added excreta. In conclusion, yeast-added excreta can be used as inoculum to estimate the IVGP and the nutritive value of the feed.

# 1. INTRODUCCIÓN

El valor nutricional de alimentos para rumiantes está determinado en conjunto por las concentraciones de sus componentes químicos, así como por el grado de digestión (Hamid *et al.*, 2007). La técnica de medición de la producción de gas *in vitro* (PGIV) a partir de la fermentación de alimentos incubados con una mezcla de líquido ruminal y de saliva artificial como inóculo, permite analizar la producción de gases (principalmente CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) generados en la fermentación (Getachew *et al.*, 2002), así como la cinética de fermentación y la digestibilidad del alimento (Storm *et al.*, 2012), la masa microbiana y la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's), para estimar de forma eficaz el contenido de energía de las dietas (Anele *et al.*, 2011).

En el caso de no disponer de animales fistulados como donantes de líquido ruminal, se ha utilizado la materia fecal como inóculo (Váradyová *et al.*, 2005). Heces frescas provenientes de ovejas y bovinos han sido utilizadas como inóculo alternativo en sustitución del líquido ruminal en la técnica de producción de gas, aunque se registró una mayor producción de gas con el líquido ruminal (Cone *et al.*, 2002; Váradyová *et al.*, 2005; Posada *et al.*, 2012). Sin embargo, Dawson *et al.* (1990), sugirieron la posibilidad de enriquecer la actividad microbiana en las excretas con levadura inactivada, que proporciona factores estimulantes para el crecimiento de las bacterias del rumen, al ser fuente de vitaminas, enzimas y cofactores. Opsi *et al.* (2012), reportaron que al adicionar levaduras inactivadas a la fermentación *in vitro* de dietas compuestas de fibra y concentrado, se mejoró la producción de gas y de AGV's *in vitro* y la estimación de la digestibilidad.

El bienestar de los animales en investigación debe ser considerado durante las fases experimentales, por lo que el uso de animales fistulados para la toma de muestra de inóculo ruminal, puede presentarse como una circunstancia de estrés y afectar el bienestar del animal, durante la cirugía y posterior a ella. Por ello, la sustitución de líquido ruminal por excretas enriquecidas con levadura inactivada como inóculo, pudiera ser una alternativa para determinar el grado de digestión y

contenido energético y la calidad nutricional de alimentos para rumiantes, a partir de la medición de la producción de gas *in vitro*. Con ello se abordan también aspectos de bienestar animal, al que la sociedad otorga cada vez más importancia, no solo por razones éticas, sino también porque los aspectos de bienestar son importantes como aspectos productivos y sanitarios, elementos integrantes de la calidad global de los alimentos, así como por implicaciones para la salud animal y la seguridad alimentaria (Rymer *et al.*, 2005; Manteca, 2012).

En el presente estudio se exploró y evaluó la posibilidad de sustituir el líquido ruminal (T1), por excretas adicionadas con levadura (T2) como inóculo alternativo dentro de la técnica de producción de gas *in vitro*, para determinar el valor nutricional en parámetros de interés de la tasa de utilización en cinco tipos de dietas representativas para ovinos, y de esta manera reducir el número de animales fistulados y/o algún otro método de extracción de líquido ruminal, contribuyendo al bienestar animal.



## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Alimentación en ovinos

La oveja (*Ovis aries*) es uno de los pequeños rumiantes de mayor importancia a nivel global, obteniendo distintos productos como su lana, carne, leche y piel (FAO, 2015). Una gran cantidad de razas de ovinos se han adaptado en distintas altitudes, climas y regiones, y son criados en una amplia gama de sistemas de producción en todo el mundo, reflejando su impacto socioeconómico (Serranito *et al.*, 2021).

De acuerdo con Hynd (2019), existen 1150 millones ejemplares de ovinos alrededor del mundo, distribuidos en Asia (44%), África (28%), Europa (11%), Oceanía (9%) y América (7%). Según Cannas *et al.* (2019), a nivel mundial los ovinos producen anualmente 2 millones de toneladas de lana, 14 millones de toneladas de carne, (esto representa 21% de la producción de carne de ganado) y 28 millones de toneladas de leche, (lo que representa 4.4% de la producción de leche de vaca).

La producción de ovinos por entidades federativas de México, puede observarse en el Cuadro 1, en donde destacan el Estado de México, Hidalgo y Veracruz, como los tres estados con más producción de ovinos.

Los sistemas intensivos o semiintensivos de crianza albergan a las ovejas de alto rendimiento, mientras que los sistemas extensivos son menos productivos (Simões *et al.*, 2021). Se han establecido diferencias en distintas razas de ovejas en sus requerimientos de energía de mantenimiento y la digestibilidad de nutrientes (Jing *et al.*, 2019). Los desafíos nutricionales de los pequeños rumiantes son altos, debido a los requisitos de producción y mantenimiento. Los ovinos de alto rendimiento requieren un manejo nutricional más sofisticado, e incluso hasta más alto que el del ganado altamente productivo (Simões *et al.*, 2021).

**Cuadro 1.** Producción de ovinos en México en 2021 (Fuente: SIAP, 2021).

	Estado	Producción (toneladas)	Precio (pesos/kg)	Valor de la Producción (miles de pesos)	Animales sacrificados (cabezas)	Peso (kg)
1	México	9,183.89	79.55	730,539.34	417,309	22.007
2	Hidalgo	6,683.21	91.85	613,830.48	318,417	20.989
3	Veracruz	5,784.35	74.06	428,370.40	294,580	19.636
4	Jalisco	4,907.29	84.86	416,443.86	218,480	22.461
5	Puebla	4,449.72	62.23	276,898.56	206,123	21.588
6	Zacatecas	4,373.26	76.23	333,392.36	212,027	20.626
7	San Luis Potosí	3,019.44	76.67	231,502.88	134,311	22.481
8	Tlaxcala	2,901.19	84.1	243,982.73	127,586	22.739
9	Oaxaca	2,456.52	78.01	191,636.90	135,458	18.135
10	Guanajuato	2,358.89	81.76	192,864.50	116,197	20.301
11	Chiapas	1,833.68	65	119,197.16	94,131	19.48
12	Michoacán	1,786.69	69.21	123,657.59	87,216	20.486
13	Campeche	1,680.35	63.04	105,926.14	97,815	17.179
14	Chihuahua	1,532.16	64.59	98,960.17	73,485	20.85
15	Nuevo León	1,487.76	78.34	116,557.45	82,349	18.067
16	Guerrero	1,458.45	70.9	103,404.46	75,981	19.195
17	Tamaulipas	1,458.00	74.75	108,986.54	89,355	16.317
18	Sinaloa	1,255.00	66.56	83,528.41	73,377	17.103
19	Querétaro	1,078.03	95.41	102,855.89	45,140	23.882
20	Yucatán	1,019.62	77.44	78,959.86	55,905	18.238
21	Aguascalientes	820	77.25	63,344.31	31,941	25.672
22	Morelos	738.11	72.17	53,272.85	35,204	20.967
23	Coahuila	685.2	62.73	42,983.11	33,091	20.707
24	Sonora	535.2	77.53	41,494.46	26,059	20.538
25	Quintana Roo	504.15	88.49	44,611.74	26,381	19.11
26	Durango	450.78	65.51	29,529.03	25,591	17.615
27	Tabasco	305.72	89.93	27,493.89	17,219	17.755
28	Baja California	301.15	79.85	24,045.95	14,539	20.713
29	Nayarit	244.52	71.88	17,576.01	11,749	20.812
30	Baja California Sur	225.67	73.33	16,549.48	13,607	16.585
31	Ciudad de México	222.95	92.96	20,725.09	9,753	22.86
32	Colima	104.76	78.87	8,262.11	5,845	17.923
	<b>Total</b>	<b>65,845.71</b>	<b>77.32</b>	<b>5,091,383.72</b>	<b>3,206,221</b>	<b>20.537</b>

Los rubros de primera importancia para la nutrición de ovinos son el agua, la energía expresada tanto en forma de nutrientes totales digestibles (TDN), como energía metabolizable (EM) o energía neta (EN), el contenido de proteína expresada tanto en forma de proteína cruda (PC), así como proteína metabolizable o proteína degradable, el contenido de minerales tales como sal, calcio, fósforo, así como los minerales traza, y las vitaminas liposolubles e hidrosolubles (Kellems y Church, 2010).

Las dietas para ovinos pueden ser formuladas mediante ecuaciones que consideran los requerimientos de energía de mantenimiento, y después calcular los requerimientos para otras funciones tales como gestación, lactancia y crecimiento (Hynd, 2019), para lo cual existen diversos programas que permiten determinar valores con precisión e incorporar diferentes requerimientos dependiendo el propósito (Hynd, 2019). Se han utilizado distintos modelos para generar dietas específicas para ovinos y sus requerimientos, los cuales fueron elaborados a partir de experimentos y animales en condiciones de temperatura y clima determinados (INRA, 1988; AFRC, 1993; CSIRO, 2007; NRC, 2007).

Durante la lactancia temprana, es importante utilizar dietas ricas en energía, proveniente principalmente del almidón, para evitar balances energéticos negativos, y poder sostener la producción de leche, tanto en razas de aptitud lechera, así como de carne o lana (Cannas *et al.*, 2002). En la etapa de lactancia media, las ovejas de alto rendimiento tienen una partición diferente de nutrientes hacia la leche o reservas corporales (Simões *et al.*, 2021). Comparada con la dieta para ganado, la dieta de ovinos generalmente tiene una mayor proporción de forraje, que los ovinos utilizan de manera eficiente y con menos necesidad de utilizar concentrados (Cheeke, 2005).

### **2.1.1 Consumo de materia seca**

Para definir la cantidad de nutrientes ingeridos y la respuesta del animal a la dieta, el consumo de alimento es una de las variables más importantes (Van Soest, 1994). Según Kellems y Church (2010) para realizar el balanceo de una dieta para ovinos, generalmente la proporción de sus ingredientes son expresados en base al contenido de materia seca (MS).

El consumo de materia seca (CMS) se ve afectado directamente por el consumo de agua. Como regla general, una oveja consume 4 litros de agua por cada kg de MS de alimento consumido (Kellems y Church, 2010). El CMS voluntario del animal puede ser calculado también a partir de la fracción de la fibra detergente neutro (FDN) de la dieta, según ecuación propuesta por Pugh (2002).

$$CMS (\% \text{ de peso corporal}) = 120 \div \%FDN$$

Donde: CMS es el consumo de materia seca (% del peso corporal) y FDN es el contenido de la fibra detergente neutra (%) de la dieta.

Se han establecido también modelos para estimar el consumo de alimentos en ovinos a partir de la materia orgánica aparente digerida y de la fibra no digerida, al asociarse con el CMS y FDN (Detmann *et al.*, 2014). Modelos más actualizados estiman el CMS a partir del FDN (Oliveira *et al.*, 2020).

$$CMS(g/kg) = -245.14 + 7.8281 \times FDN - 0.0113(FDN^2) \text{ Cuando } FDN < 308 \text{ g/kg}$$

$$CMS (g/kg) = 1303.03 - 0.6787 \times FDN \text{ Cuando } FDN > 308 \text{ g/kg}$$

Donde:

CMS (g/día): consumo de materia seca

FDN (g/kg): fibra detergente neutro en la dieta

El consumo voluntario de alimento se ve afectado por las características de la dieta. Al mezclar concentrados y forrajes en una misma dieta el consumo es mayor que alimentarlos por separado, debido al equilibrio estable de la población microbiana del rumen, lo que contribuye a mejorar la digestibilidad de los componentes del forraje (Fuller, 2004).

### **2.1.2 Digestibilidad**

La digestibilidad, también definida como eficiencia de absorción, que puede calcularse para materia seca, materia orgánica o cualquier otro nutriente, es un parámetro importante al interpretar el valor nutricional de alimentos (Lawrence *et al.*, 2013). Uno de los métodos para determinar el valor nutricional de alimentos para rumiantes, es la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, introduciéndola por primera vez Tilly y Terry en 1963.

La digestibilidad de la materia orgánica es definida como la proporción de materia orgánica del alimento, que aparentemente es digerida en el tracto digestivo del rumiante (Al-Arif *et al.*, 2017). La digestibilidad de la materia orgánica puede ser estimada a partir de los componentes de la pared celular de los piensos, tales como FDN, FDA, Fibra cruda (Sauvant *et al.*, 2002), o por la cantidad de gas producido durante una incubación de la dieta en cuestión, en líquido ruminal *in vitro* (Menke y Steingass, 1979).

Un equipo comúnmente utilizado y eficiente, es el equipo de digestibilidad *in vitro* (DaisyII; ANKOM Technology Corp., Fairport, NY), en el que las muestras de alimento se colocan en bolsas de poliéster selladas para ser incubadas en un inóculo consistente en líquido ruminal y saliva artificial, en donde el alimento que desaparece durante la incubación se considera digerido en el rumen.

Existen factores que pueden afectar la digestibilidad de un alimento, tales como su contenido de materia seca, procesamiento, propiedades, además del estatus fisiológico del animal, especie de rumiante, entre otros (Li *et al.*, 2023). Se ha observado que existe una menor digestibilidad en piensos ricos de material fibroso

a comparación con piensos de un contenido elevado de nutrientes orgánicos tales como proteína, grasa y carbohidratos solubles (Patil y Patil, 2022). Otro factor que afecta la digestibilidad es el consumo, al existir un aumento en la cantidad de alimento ingerido suele provocar una mayor velocidad del paso para su digestión, provocando una menor exposición a enzimas digestivas concluyendo con una disminución en la digestibilidad (McDonald *et al.*, 2011). Los alimentos que contienen cantidades altas de proteína cruda tienden a tener mayor digestibilidad, al ser la proteína un componente orgánico altamente digestible (Patil y Patil, 2022). Las grasas contenidas en la dieta, tienen potencial para interferir en la fermentación microbiana reduciendo la digestibilidad de carbohidratos fibrosos (Jenkins, 2011). En general, los ácidos grasos insaturados reducen la fermentación ruminal y la digestibilidad más que los ácidos grasos saturados (Jenkins, 2011).

La digestibilidad de la celulosa es reducida cuando las dietas contienen altos niveles de carbohidratos solubles, tales como la melaza (Patil y Patil, 2022). Generalmente las fracciones de carbohidratos son el mayor componente dentro de una dieta para rumiantes, mientras que la fracción de fibra cruda de la dieta tiene la menor digestibilidad (Patil y Patil, 2022).

### **2.1.3 Energía de mantenimiento**

La cantidad de energía requerida para el mantenimiento es aquella necesaria para mantener su equilibrio energético (McDonald *et al.*, 2010). El balance energético puede ser calculado mediante la diferencia que existe entre la ingesta bruta de energía y la suma de la energía fecal, la energía de orina, la energía de metano y la producción de calor (Yang *et al.*, 2020), o mediante estudios calorimétricos (Deng *et al.*, 2014; Salah *et al.*, 2014; Fonsêca *et al.*, 2019). En general, los requerimientos de mantenimiento son proporcionales al peso metabólico de los animales. La insuficiencia energética probablemente limita el rendimiento de ovinos más que cualquier otra deficiencia nutricional (NRC, 2007). Deficiencias de energía a largo plazo pueden impactar la producción en ovinos por hasta 2 o 3 meses posteriores al reinicio de un adecuado consumo energético (NRC, 2007).

La evaluación de la condición corporal de ovinos es importante para estimar la condición de consumos energéticos durante largos periodos (Kellems y Church, 2010). Deficiencias energéticas causan reducción del crecimiento, fertilidad, calidad y cantidad de lana, y en casos severos, la muerte (Kellems y Church, 2010).

Es necesario tomar en cuenta costos energéticos de las actividades del ovino para calcular de manera correcta la cantidad de energía neta que pueden utilizar para procesos productivos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Requerimientos energéticos de actividades físicas en ovinos de 50 kg.

Actividad	Requerimiento por kg de peso vivo	Frecuencia	Requerimiento de Energía (kJ/día)
Estar de pie	0.40 kJ/h	9 h/día	180
Cambiar de posición	0.26 kJ	6 veces/día	78
Caminar	2.60 kJ/km	5 km/día	650
Escalar	28.00 kJ/km	0.2 km/día	280
Comer	2.50 kJ/h	2-8 h/día	250-1000
Rumia	2.00 kJ/h	8 h/día	800
Metabolismo rápido			4300

Obtenido y adaptado de McDonald *et al.* (2011).

Los requerimientos energéticos de mantenimiento determinados para pequeños rumiantes tienen similitudes a los establecidos a grandes rumiantes, pero con algunos aspectos que distinguen sus requerimientos de energía y proteína entre grandes y pequeños rumiantes (Tedeschi y Fox, 2018). En el caso de corderos cruzados de Dorper x Santa Inés, se determinó el requerimiento de energía neta de mantenimiento en 71.00 kcal/kg PCV<sup>0.75</sup>/día (Mendes *et al.*, 2021).

Para el caso de corderos machos castrados en crecimiento, de raza de pelo Santa Inés, desarrollada para climas tropicales, con rangos de peso corporal de 15 a 30 kg han sido determinados a razón de 402 a 725 kcal ENm/día (Barcelos *et al.*, 2020). Yang *et al.* (2020), determinaron en China, requerimientos de energía neta y energía metabolizable para mantenimiento de borregos de razas de lana (ej. Texel y Suffolk) entre 40% y 53% superiores a los utilizados en los sistemas de alimentación para

ovinos en Estados Unidos y el Reino Unido. En cambio, requerimientos totales de energía neta para razas de ovinos de pelo adaptadas a regiones tropicales en Brasil, 30 a 36% inferiores a los informados por sistemas Nutrient Requirements Council (NRC) y AFRC fueron reportados por Oliveira *et al.* (2018).

Durante los últimos 30 años, asociado al mejoramiento genético de los rumiantes, sus requerimientos energéticos de mantenimiento han incrementado, asociado a mayores tasas metabólicas relacionadas con mayor productividad (Zou *et al.*, 2016).

Asociado al sexo, los corderos machos y castrados tienen requerimientos de energía neta de mantenimiento 13 y 18%, respectivamente, menores que las hembras (Yang *et al.*, 2020).

La energía necesaria para ganancia de peso varía según el crecimiento alcanzado, habiendo reportado valores en el rango de 181 kcal ENg/día en corderos de 15 kg de peso corporal, con una ganancia diaria de peso de 100 g/día, hasta 1137 kcal ENg/día, para corderos de 30 kg de peso corporal, con una ganancia diaria de peso de 300 g/día (Barcelos *et al.*, 2020).

Tedeschi y Fox (2018) establecieron que la energía neta requerida para mantenimiento (ENrm en Mcal/día) de ovejas y cabras se puede calcular a partir de:

$$ENrm \text{ (Mcal/día)} = ENrm_{Basal} + ENrm_{Act} + ENrm_{Ef} + ENrm_{Urea}$$

Donde:

ENrm<sub>basal</sub> (Mcal/día): energía neta requerida para el mantenimiento basal

ENrm<sub>Act</sub> (Mcal/día): energía neta requerida para la actividad física en mantenimiento

ENrm<sub>Ef</sub> (Mcal/día): energía neta requerida para el mantenimiento en estrés por frío

ENrm<sub>Urea</sub> (Mcal/día): energía neta requerida (Mcal/día) para el mantenimiento del ciclo de urea



#### 2.1.4 Energía para crecimiento

Para determinar la energía necesaria para el crecimiento en ovinos, se propuso considerar incluir en una ecuación la composición corporal y el contenido de energía del tejido en crecimiento. Se consideraron valores específicos de la eficiencia parcial de la utilización de energía metabolizable para mantenimiento ( $k_m$ ) y para crecimiento ( $k_g$ ) (Tedeschi *et al.*, 2010). Las ecuaciones propuestas por el modelo Small Ruminant Nutrient System (SRNS) son:

$$PGD (g/día) = \frac{EMdc \times k_g \times 1000}{0.92 \times CEG}$$

Donde:

PGD (g/día):	promedio de ganancia diaria
EMdc (Mcal/día):	energía metabolizable disponible para crecimiento
$k_g$ (adimensional):	eficiencia parcial del uso de energía metabolizable para energía neta
CEG (Mcal/kg):	contenido de energía para ganancia

$$EMdc = CEM - (EMrm + EMrg + EMrl)$$

Donde:

EMdc (Mcal/día):	energía metabolizable disponible para crecimiento
CEM (Mcal/día):	consumo de energía metabolizable
EMrl (Mcal/día):	energía metabolizable requerida para lactancia
EMrm (Mcal/día):	energía metabolizable requerida para mantenimiento
EMrg (Mcal/día):	energía metabolizable requerida para gestación

$$k_g = \frac{18.36}{27 + 41 \times ERp}$$

Donde:

$k_g$  (adimensional): eficiencia parcial del uso de energía metabolizable para energía neta

$ERp$  (adimensional): energía retenida como proteína

$$R = 2 \times (L - 1)$$

Donde:

$R$  (adimensional): ajuste para la ganancia o pérdida

$L$  (adimensional): consumo sobre el factor de requerimientos de energía para mantenimiento igual a 1

$$ER_{Prot} = PEG \times 5.7/100$$

Donde:

$ER_{Prot}$  (Mcal/kg): energía retenida de la proteína

$PEG$  (%): proteína en la ganancia

$$PEG = \left[ 215 - 4 \times R - \frac{120 - 4 \times R}{1 + e^{-6X(P-0.4)}} \right] / 10$$

Donde:

$PEG$  (%): proteína en la ganancia

$R$  (adimensional): ajuste para la ganancia o pérdida

$P$  (BW/estándar BW): grado de madurez

$$ER_{Grasa} = GEG \times 9.4/100$$

Donde:

ER<sub>Grasa</sub> (Mcal/kg): energía retenida para grasa

GEG (%): grasa en la ganancia

$$GEG = \left[ 43 + 28 \times R - \frac{490 - 28 \times R}{1 + e^{-6X(P-0.4)}} \right] / 10$$

Donde:

GEG (%): grasa en la ganancia

P(BW/estándar BW): grado de madurez

R (adimensional): ajuste para la ganancia o pérdida

### **2.1.5 Energía para gestación**

Para establecer los requerimientos energéticos de las ovejas durante la gestación Tedeschi y Fox (2018) recomiendan tomar en cuenta el peso del útero y del cordero al nacimiento, sin embargo, estos modelos deben ser utilizados a partir del día 62 de gestación.

$$PUG = (PCN/4) \times 175.915 \times e^{-8.38xe^{-0.00608xt}}$$

$$PGD_{UT} = \left( \frac{PCN}{4} \right) \times 8.96293 \times e^{-8.38xe^{-0.00608xt} - 0.00608xt}$$

$$ENrg = \left( \frac{PCN}{4} \right) \times 36.628 \times e^{-11.46xe^{-0.00643xt} - 0.00643xt}$$

$$EMrg = ENrg/0.13$$

Donde:

PUG (kg):	peso del útero en gestación
PCN (kg):	peso del cordero al nacer
t (días):	tiempo de gestación
PGD <sub>UT</sub> (kg):	promedio de ganancia diaria del útero
ENrg (Mcal/día):	energía neta requerida para gestación
EMrg (Mcal/día):	energía metabolizable requerida para gestación

### **2.1.6 Energía para lactancia**

La energía neta requerida para lactancia (ENrl) puede ser determinada a partir del contenido de energía bruta de la leche de la oveja, del contenido de grasa, y del contenido de proteína cruda de la leche, utilizando 0.93 como coeficientes para ovejas (Caanas *et al.*, 2004).

$$ENrl \text{ (Mcal/día)} = RL \times (0.25173 + 0.08964 \times CGL + 0.03785 \times CPvL/0.93)$$

Donde:

ENrl (Mcal/día):	energía neta requerida para lactancia
RL (kg/día):	rendimiento de leche
CGL (g/100 g):	contenido de grasa en la leche
CPvL (g/100 g):	contenido de proteína verdadera de la leche

Considerando que la eficiencia parcial del uso de la energía metabolizable para lactancia (energía neta de lactancia ENrl) es constante a 64.4% (Tedeschi y Fox, 2018), se pueden determinar los requerimientos de energía metabolizable para pequeños rumiantes con la siguiente fórmula.

$$EMrl \text{ (g/día)} = ENrl/0.644$$

### **2.1.7. Proteína para mantenimiento**

Los requerimientos proteicos de los ovinos pueden ser estimados a partir de valores de proteína cruda utilizados para diferentes propósitos productivos, basados en conocimientos de digestión y metabolismo de proteínas (Hynd, 2019).

Se han determinado parámetros como la proteína metabolizable para mantenimiento (PMm) a partir del peso corporal vacío (PCV), con valores para corderos entre 15 y 30 kg, de 18.21 hasta 32.85 g/día (Barcelos *et al.*, 2020). Mendes *et al.* (2021) ha establecido que la proteína de mantenimiento para corderos cruzados con Dorper x Santa Inés de 4 meses de edad es de 1.75 g/kg PCV<sup>0.75</sup>/día.

El estado de nutrición de la oveja se ve reflejado también en el crecimiento de su lana. Especialmente importante es el papel de aminoácidos sulfurados metionina y cisteína, para el crecimiento de lana (Cheeke, 2005; Hynd, 2019).

También se han establecido requerimientos de proteína metabolizable para ganancia (PMg) a partir de la proteína neta de ganancia (PNg) y la eficiencia de utilización de la proteína (Barcelos *et al.*, 2020).

Las ovejas y las cabras eventualmente consumen una dieta cuyo contenido proteínico es hasta tres veces superior al contenido proteínico promedio de la dieta que se les ofrece, al consumir selectivamente entre las especies de pastos presentes en el pastizal y seleccionando y consumiendo dentro de cada planta las partes finas de las hojas y las semillas, utilizando para ello sus labios superiores móviles y hendidos (Hynd, 2019). En la mayoría de las situaciones la cantidad de proteína en la dieta es más crítica que su calidad, ya que rumiantes tienen la habilidad de convertir proteína de baja calidad a proteína de alta calidad por la acción de sus bacterias ruminales (NRC, 2007).

### **2.1.8 Proteína de mantenimiento para ovejas no lactantes**

Los requerimientos proteicos para mantenimiento de ovejas, pueden establecerse como proteína metabolizable necesaria para mantenimiento (PM<sub>rm</sub> en g/día), a partir de modelos que toman en cuenta la suma de la proteína de lana y piel, así como las pérdidas de proteína endógena urinaria y la proteína endógena fecal, utilizando la fórmula propuesta por Tedeschi y Fox (2018).

$$PM_{rm} (g/día) = \frac{0.147 \times (PCA - PUG) + 3.375}{0.67} + \frac{15.2 \times CMS}{0.67} + \frac{Lana\ limpia}{0.6 \times 365}$$

Donde:

PCA (kg):	peso corporal del animal
PUG (kg):	peso del útero gestante
CMS (kg/día):	consumo de materia seca
Lana limpia (kg/año):	rendimiento de lana

### **2.1.9 Proteína para crecimiento**

Para determinar el requerimiento de proteína metabolizable para crecimiento, se debe considerar la proteína neta necesaria para crecimiento y esto debe ser relacionado con la ganancia de proteína en % (PEG). Tedeschi y Fox (2018) propusieron determinar los requerimientos de proteína para ovejas en crecimiento, con modelos similares a los del (RNS) (Ruminant Nutrition System), asumiendo una constante de 0.7, como eficiencia del uso de proteína metabolizable para proteína neta.

$$PM_{rc} (g/día) = PN_{rc}/0.7$$

$$PN_{rc} (g/día) = GPV \times PEG/100$$

$$GPV (g/día) = 0.92 \times PGD$$

Donde:

PMrc (g/día):	proteína metabolizable requerida para crecimiento
PNrc (g/día):	proteína neta requerida para crecimiento
GPV (kg/día):	ganancia de peso vacío
PEG (%):	ganancia de proteína
PGD (g/día):	promedio de ganancia diaria de peso

### **2.1.10 Proteína para lactancia**

La proteína neta requerida para lactancia (PNrl) se puede calcular a partir del contenido de proteína verdadera de la leche, considerando una eficiencia de conversión de proteína metabolizable a proteína neta de 0.58, según propuesto por INRA (1988).

$$PNrl (g/día) = RL \times (CPvL \times 10)$$

$$PMrl (g/día) = PNrl/0.58$$

Donde:

RL (kg/día):	rendimiento de leche
CPvL (g/100 g):	contenido de proteína verdadera de la leche

### **2.1.11 Proteína para gestación**

Los requerimientos de proteína en ovejas durante la gestación se determinan siguiendo la recomendación de CSIRO (2007), donde la eficiencia de utilización de la proteína metabolizable y neta para gestación es constante a 0.7.

$$PNrg = (PCN/4) \times 5712.24 \times e^{-11.22 \times e^{-0.00601 \times t} - 0.00601 \times t}$$

$$PMrg = PNrp/0.7$$

Donde:

PNrp (g/día):	proteína neta requerida para gestación
PMrp (g/día):	proteína metabolizable requerida para gestación
PCN (kg):	peso del cordero al nacer
t (días):	tiempo

### **2.1.12 Minerales**

Los minerales son compuestos inorgánicos que están presentes en las cenizas del alimento y que, específicamente en el caso de  $Ca^{2+}$ ,  $P^+$  y  $Mg^{2+}$ , están asociados con el sistema óseo del animal en concentraciones altas, y algunos otros tales como Se, Cu, Mn y  $Zn^{2+}$ , están asociados en menor concentración actuando como cofactores en reacciones enzimáticas de las células (Kellems y Church, 2010).

Para la nutrición ovina existen 14 minerales esenciales, clasificados como macrominerales (concentraciones mayores a 100 ppm) tales como NaCl, Ca, P, Mg, K y S y los microminerales o minerales traza, en el caso de Cu, Fe, I, Mn, Se, Zn y Co (Kellems y Church, 2010).

Considerando los requerimientos específicos de minerales para ovinos, generalmente es necesario suplementar con mezclas de calcio y fósforo en etapas de gestación o lactancia, para evitar hipocalcemia, y además suplementar los



demás minerales en su justa medida para reducir la posibilidad de sus deficiencias, lo que puede hacer más resistentes a los animales frente a enfermedades (Cheeke, 2005).

La sal (NaCl) tiene múltiples funciones en el animal, por lo que su deficiencia tiende a reducir el consumo de alimento y agua, provocando una reducción en la tasa de crecimiento y producción de leche (Kellems y Church, 2010).

La suplementación de calcio es necesaria, especialmente en ovejas que se encuentran en lactancia, aunque la mayoría de los pastos o forrajes cuentan con una adecuada cantidad de calcio, al contrario de los granos, los cuales son deficientes en este mineral (Kellems y Church, 2010).

El fósforo es especialmente importante en etapas como la gestación tardía y la lactancia, por lo que al presentarse periodos largos de deficiencias en este mineral, se provocan rendimientos pobres en la reproducción de ovinos (Kellems y Church, 2010). La relación calcio:fósforo ha sido considerada como importante para la formulación de dietas para ovinos, en las que proporciones de 5:1 o 6:1 (Ca:P) son satisfactorias, mientras que proporciones de 2:1 son ideales para la mayoría de las raciones en ovinos.

El cobre juega un papel de alta importancia en la activación de reacciones enzimáticas en la célula. Sin embargo, específicamente para los ovinos, existe un delicado balance entre su toxicidad y sus requerimientos (Kellems y Church, 2010), ya que toxicidad por cobre en ovinos puede surgir rápidamente al acumularse este mineral en células del hígado, lo que provoca su rompimiento. Como consecuencia de ello, se causa hemólisis en la sangre, seguida de anemia, despigmentación de lana y orina con coloración roja (Cheeke, 2005).

Deficiencias de cobre en ovejas provoca anemia, así como fragilidad y despigmentación de la lana (Hynd, 2019). Los requerimientos de cobre varían de 7 a 11 mg/kg de MS (NRC, 2007), sin embargo, en la dieta se presentan valores que van desde 1 - 86 mg/kg de MS de la dieta (ARC, 1980).

Deficiencias de Cobalto provocan pobre crecimiento, incrementa la fotosensibilidad, anemia y trastornos neurológicos (Hynd, 2019).

### **2.1.13 Vitaminas**

La mayoría de los alimentos cuentan con ciertas vitaminas, en concentraciones muy variable, debidas principalmente a factores relacionados con la cosecha, con el procesamiento, condiciones de almacenamiento, especies de planta y de las partes (semilla, tallo y hojas) de la planta (Kellems y Church, 2010).

Las vitaminas descritas como limitantes en dietas incluyen las vitamina liposolubles A, D, E, así como vitaminas hidrosolubles: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, niacina, colina, y cobalamina (B<sub>12</sub>) (Kellems y Church, 2010). Ovinos cuyo rumen es funcional, requieren solo ocasionalmente suministro suplementario de las vitaminas liposolubles, tales como A, D, E y K (Pugh, 2002).

## **2.2 Evaluación de los alimentos respecto a la tasa de utilización de nutrientes y energía**

### **2.2.1 Métodos *in vivo* e *in situ***

Existen métodos *in vivo* para medir el contenido de energía, digestibilidad del alimento, y el comportamiento productivo de los animales, los cuales son caros debido a que consumen mucho tiempo, son logísticamente complejos, requieren acceso a varios animales y una gran cantidad de material de prueba (Villalobos *et al.*, 2000). Por ejemplo, animales vivos provistos con métodos quirúrgicos de una fistula esofágica, permiten monitorear la ingesta, la digestión y el metabolismo proporcionando una ventana que permite a científicos medir las poblaciones y la actividad de los microorganismos ruminales, características de los productos de fermentación y la motilidad ruminal (Schwartzkopf *et al.*, 2003).

Determinar la digestibilidad de la alimentación *in vivo* es laborioso, y tiene alto costo, ya que requiere grandes cantidades de pienso y es en gran parte inadecuado para

piensos individuales (Aregheore, 2000). Se pueden utilizar técnicas *in vitro*, menos costosas y que requieren menos tiempo que los ensayos *in vivo* (Arbabi *et al.*, 2017), preservando las condiciones experimentales con mayor precisión (Menke *et al.*, 1979).

Otro método que se utiliza para evaluar la degradación de alimentos en el rumen es la técnica *in situ*, en la que se mantienen las condiciones reales del rumen (Nocek, 1988). En esta técnica *in situ* se introducen muestras de alimento a bolsas de nylon o poliéster con poros de entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  (Villalobos *et al.*, 2000) debidamente pesadas ( $\pm 0.0001$  g). Al completar los diferentes tiempos a los que se desea terminar la incubación, las bolsas son recuperadas, lavadas y el peso del residuo es utilizado para calcular la degradación de nutrientes. De esta manera, se determina el grado y tasa de degradación (Offner *et al.*, 2003; López, 2009; Hristov *et al.*, 2019).

Debido a varias limitaciones que presenta la técnica *in situ* no ha sido generalmente aceptado como una alternativa satisfactoria para la valoración nutricional de los alimentos (Mohamed y Chaudhry, 2021; Olaisen *et al.*, 2003). Por ejemplo, es importante considerar el tamaño del poro de las bolsas de nylon, ya que al ser un poro demasiado pequeño ( $< 20 \mu\text{m}$ ) los protozoos no logran entrar, mientras que si el poro es mayor que  $50 \mu\text{m}$ , partículas de alimento con tamaño pequeño pueden entrar y/o salir sin haber sido digeridas (Villalobos *et al.*, 2000).

El método *in situ* tiene también algunas desventajas cuando se evalúan alimentos ricos en aceite, en los cuales se pueden formar películas que obstruyen los poros, inhibiendo el movimiento de agua, esencial para inocular el alimento y eliminar los productos de la digestión (Owens y Basalan, 2016).

### 2.3 Producción de gas *in vitro*

Tradicionalmente el valor alimenticio de las dietas ha sido determinado mediante análisis proximal y coeficientes de digestibilidad tabulados, obtenidos de experimentos en los cuales se ofrece alimentación a nivel de mantenimiento (Krizsan *et al.*, 2012).

La técnica de producción de gas *in vitro* (PGIV), cuyo fundamento consiste en simular en laboratorio bajo condiciones controladas el ecosistema del rumen, así como parámetros ambientales tales como la temperatura, pH, anaerobiosis y el aporte de minerales, ha sido utilizada para evaluar forrajes, alimentos, dietas y aditivos en la fermentación ruminal (Storm *et al.*, 2012).

La degradación de las muestras de alimento incubadas en el sistema de fermentación con inóculo de líquido ruminal, permite describir matemáticamente la cinética mediante curvas de producción de gas en laboratorio (Suassuna *et al.*, 2023). La PGIV permite evaluar la disponibilidad de energía (Owens y Basalan, 2016) y grado de digestibilidad en un período de tiempo (Zavaleta, 2013) en alimentos regionales en países en desarrollo.

El método de PGIV es utilizado por investigadores como sustituto de los ensayos *in vivo* (López, 2009). Según Hatew *et al.* (2015) y Liu *et al.* (2009), un problema potencial al evaluar alimentos con la técnica de producción de gas *in vitro* podría ser que los resultados obtenidos tuvieran discrepancia notoria con los obtenidos con técnicas *in vivo*, debido a la reproducibilidad y repetibilidad de los perfiles de producción de gas a las 24 y 48 horas. Esto lo que hace necesario que se tenga una mayor estandarización de los procedimientos, tratando de lograr una mayor uniformidad en las técnicas existentes (Cornou *et al.*, 2013; Hristov *et al.*, 2019).

A pesar de que la fermentación de los alimentos en cargas o lotes (batch) no es exactamente el tipo de fermentación de paso continuo que ocurre en el rumen, el tamaño de varias muestras y sus índices relativos de PGIV cuando son comparados con estimaciones *in vivo* puede ayudar a guiar a los nutricionistas para crear

modificaciones apropiadas en las dietas mejorando la productividad (Owens y Basalan, 2016).

La medición de la producción de gas *in vitro* a partir de la fermentación ruminal para evaluar la degradación de alimentos inició con los trabajos de Mcbee (1953) y Hungate (1966). En esa época, se determinó la degradación de sustratos a un punto fijo, con el procedimiento *in vitro* para estimar la digestión ruminal, de Tilley y Terry (1963). Este procedimiento implica la incubación del alimento en una probeta con capacidad de 100 ml, utilizando líquido ruminal tamponado como inóculo, en un recipiente anaeróbico, a una temperatura de 39°C, en un periodo de incubación extendido a 12, 24, y/o 48 y hasta 96 h.

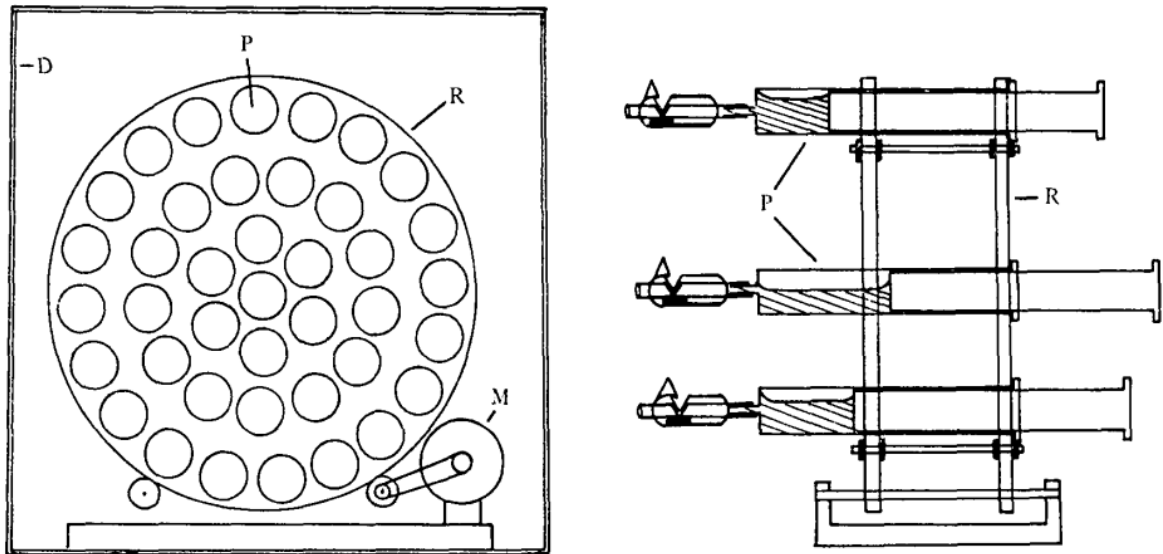
Czerkawski y Breckenridge (1977) desarrollaron un sistema a partir del desplazamiento de un émbolo, por efecto del gas producido durante la fermentación en una jeringa de vidrio.

Menke et al. (1979) utilizaron la técnica con jeringas a punto final después de 24 h de incubación, determinando la producción de gas manualmente (Figura 1). Esta técnica fue modificada por Blümmel y Ørskov (1993), manteniendo las jeringas en una incubadora rotatoria, obteniendo la cinética de fermentación a partir de mediciones en la producción de gas en intervalos frecuentes.

Según Tagliapietra *et al.* (2012), la acumulación de gas en la jeringa incuba a 48 horas, podría afectar la liberación de gas del fluido ruminal, y reducir la velocidad de fermentación del sustrato. Por ello, en algunos sistemas es ventilada la acumulación de gas a intervalos regulares (Mauricio *et al.*, 1999).

Procedimientos en el que no era necesario medir el desplazamiento de un émbolo, sino que se mide la presión de gas utilizando un transductor de presión manual, fue descrito por Wilkins (1974) y seguidamente por Theodorou (1994). Los resultados obtenidos de presión en kg/cm<sup>2</sup>, se transforman a ml de gas/g de materia seca o materia orgánica fermentada. La medición del volumen de gas producido ha evolucionado mediante sensores de presión a tiempo real, en sistemas de expulsión de gases automatizados (Muetzel *et al.*, 2014). Además, estos sensores pueden ser

conectados inalámbricamente a una computadora donde se regula el tiempo y la presión (Cornou *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Pistón-jeringas (P) en un rotor (R), moviéndose por motor eléctrico (M), en horno de secado (D) a  $39 \pm ^\circ\text{C}$ . (Fuente: Menke *et al.*, 1979).

Se han elaborado técnicas semiautomatizadas y automatizadas, en las que se mide la acumulación de gas en el espacio de las cabezas de botellas (Van Gelder *et al.*, 2005; Corredú *et al.*, 2019). Estos estudios no han sido estandarizados respecto al cálculo de repetibilidad y reproducibilidad, por lo que es frecuente encontrar diferencias entre laboratorios. Estas limitaciones implican que se deben hacer correcciones adecuadas al utilizarse el líquido ruminal como inóculo, debido principalmente a autodegradación de microbios en incubaciones a largo plazo, retención de partículas durante el periodo de incubación, liberación de  $\text{CO}_2$ , y falta de adaptación microbiana a los sustratos fermentados (Owens y Basalan, 2016).

## 2.4 Inóculos en PGIV

### 2.4.1 Inóculo de líquido ruminal

Para realizar la técnica de PGIV es necesario utilizar un inóculo, que realizará la fermentación del alimento durante un determinado tiempo de incubación (Menke *et al.*, 1979; Aiple *et al.*, 1992; Blümmel y Ørskov, 1993). El inóculo que normalmente es utilizado, es el líquido ruminal, proveniente de animales adaptados a una dieta estándar, la cual debe contener ingredientes similares a los que se desean evaluar, debido a que la composición y tipo de dieta, ya sea concentrado o forraje, determinan su capacidad fermentativa (Amanzougarene *et al.*, 2020) y el grado de adecuación al sustrato a estudiar (Mould *et al.*, 2005), por lo que es necesario estandarizarlo de la mejor manera posible (Tassone *et al.*, 2020).

Para llevar a cabo la técnica de PGIV, es necesario diluir el inóculo que permita evitar una concentración excesiva de metabolitos intermedios que pudieran inhibir la fermentación, pero sin que esto llegue a limitar la disponibilidad de nutrientes a los microorganismos (Amanzougarene y Fondevila, 2020). Los filos más predominantes de bacterias en el líquido ruminal de ovejas no gestantes son Firmicutes (43.6%), Bacteroidetes (30.38%), Proteobacteria (10.14%), Verrucomicrobia (7.55%) y 13 filos más que representan 8.3% del total del microbioma (Minozzi *et al.*, 2021).

Las clases con mayor abundancia son Clostridiales (41.5%) y Bacteroidales (30.1%). Las familias Ruminococcaceae (28.6%), Rikenellaceae (10.5%) y Campylobacteraceae (7.9%), y géneros Ruminococcaceae (8.8%) y Campylobacter (7.9%) (Minozzi *et al.*, 2021).

El líquido ruminal puede obtenerse de distintas formas para ser utilizado como inóculo, de las cuales, una de las más comunes es a través de una fístula ruminal, es decir a través de una abertura del rumen llevada a cabo por medio de una intervención quirúrgica realizada por médicos veterinarios expertos en cirugía experimental. En esta abertura se coloca una cánula de silicón autosostenible, a

través de cuya tapa se puede obtener acceso al inóculo del contenido ruminal, y posteriormente cerrar debidamente la tapa de la cánula, para mantener condiciones de anaerobiosis en el contenido ruminal del animal donador.

Una de las limitaciones de la técnica de PGIV cuando se utilizan animales fistulados para obtener muestra de inóculo (Posada *et al.*, 2012), es que este tipo de técnica se encuentra restringida en varios países, atendiendo consideraciones éticas relacionadas con el bienestar animal, al ser la fistulación un proceso invasivo al animal. También, se han registrado problemas postquirúrgicos, tales como infecciones, lo cual hace necesario tener un mayor cuidado y alto costo de mantenimiento de los animales fistulados del rumen (Pandian *et al.*, 2016).

Otros métodos han sido evaluados como potenciales para sustituir a los animales fistulados, tales como la utilización de una sonda orogástrica introducida a través del hocico del animal y del esófago, hasta posicionarla en el rumen, para coleccionar el líquido ruminal al aplicar una presión negativa. Sin embargo, esta técnica también es considerada invasiva al animal (Gastelen *et al.*, 2019).

Se ha propuesto utilizar líquido ruminal de animales sacrificados (Alba *et al.*, 2018), aunque una gran desventaja de esto estriba en no conocer las condiciones de altitud (Wu *et al.*, 2020), temperatura ambiental (Cholewińska *et al.*, 2021), edad (Yin *et al.*, 2021), sexo (He *et al.*, 2018), de alimentación y de transporte en la que estuvieron los animales, previo al sacrificio (Pino *et al.*, 2018).

#### **2.4.2 Inóculo de excretas**

Los rumiantes tienen la capacidad de fermentar residuos de alimento en su intestino grueso, y una población significativa de microorganismos en el colon y en las excretas fecales (Pandian *et al.*, 2016). Según Mohammadzadeh *et al.* (2014), las excretas tienen concentraciones de bacterias y arqueas productoras de metano similares a las del líquido ruminal, presentando solamente concentraciones de protozoarios menores en excretas que en líquido ruminal.



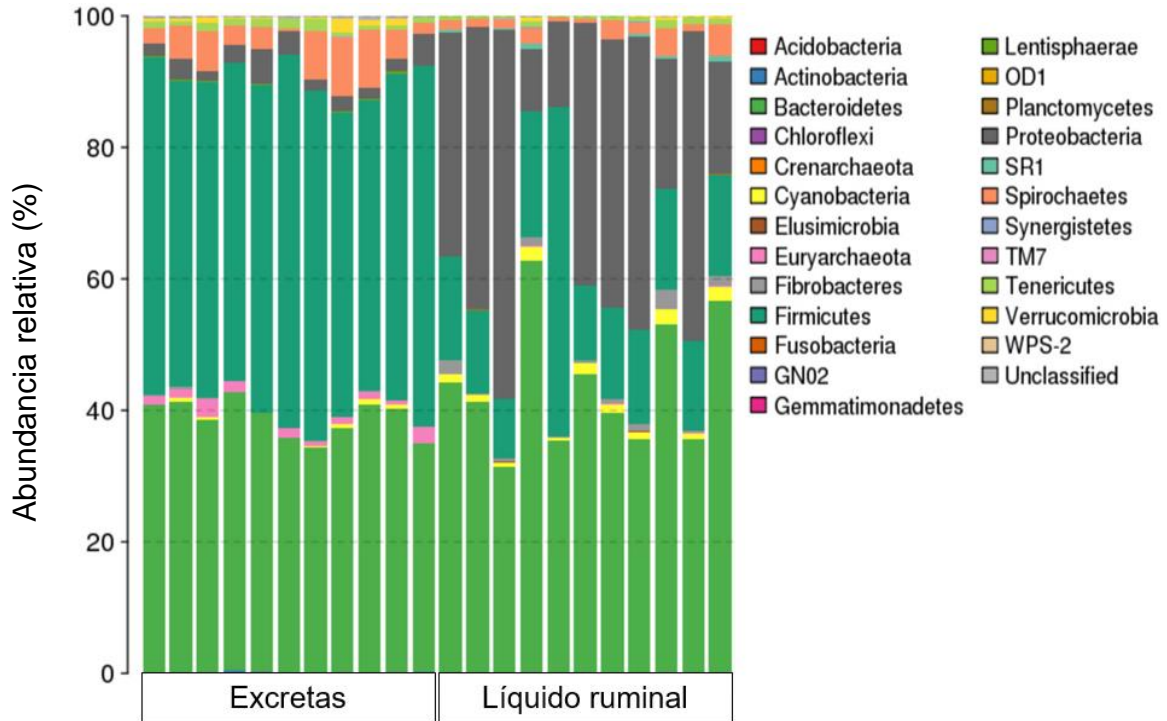
Los principales filos bacterianos del líquido ruminal, tales como Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria y Verrucomicrobitalos, se pueden observar en excretas de caprinos lecheros Saanen jóvenes y maduros (Luo *et al.*, 2022). Sin embargo, el líquido ruminal y las excretas fecales mantienen concentraciones diferentes de filos, tales como Cyanobacteria, Fibrobacteres, Lentisphaerae, Tenericutes, Spirochaetes, Firmicutes y Bacteroidetes (Jeferson *et al.*, 2020).

Mamun *et al.* (2020) reportaron que las heces provenientes de ovinos Merino mostraron mayor predominancia en filos Firmicutes y Bacteroides de la población de microorganismos total. También se ha encontrado, que tanto el líquido ruminal, como las heces de ganado, presentan especies y concentraciones similares, principalmente de géneros como *Prevotella*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Zhou *et al.*, 2023).

En la Figura 2 se muestra que la microbiota del líquido ruminal y de heces en vacas lecheras tiene diferentes filos de bacterias (Mu *et al.*, 2019). De un total de 20 filos reportados en líquido ruminal, aquellos cuya abundancia superó el 1%, fueron Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Spirochaetes y Cyanobacteria (Figura 2). En cuanto a las muestras fecales, se identificaron un total de 22 filos, y los filos predominantes fueron Bacteroidetes, Firmicutes, Spirochaetes, Proteobacteria, Euryarchaeota y Tenericutes (Mu *et al.*, 2019).

Las excretas o heces han sido evaluadas como inóculos alternativos para la medición de PGIV, AGV's, digestibilidad y energía metabolizable (Aiple *et al.*, 1992; El-Meadaway *et al.*, 1998; Cavalcante *et al.*, 2015; Ramin *et al.*, 2015). Utilizar heces frescas como inóculo presenta algunas ventajas, tales como la facilidad de obtener excretas de animales y evitar el uso de animales fistulados (Chiaravalli *et al.*, 2019). Sin embargo, también tienen algunas limitaciones, tales como una menor actividad enzimática que la encontrada en el líquido ruminal (Hughes *et al.*, 2012; Mauricio *et al.*, 2001). Por ese motivo, ha habido propuestas de enriquecer las excretas con

enzimas (Bai *et al.*, 2021) o con aditivos, tales como levadura (Opsi *et al.*, 2012), que han permitido obtener valores de producción de gas mayores.



**Figura 2.** Distribución de la composición taxonómica de líquido ruminal y excretas a nivel filo. Eje “x” representa las muestras a partir de excretas o líquido ruminal de vacas en alta producción. El eje “y” representa la abundancia relativa (%) de cada filo. Obtenido y modificado de Mu *et al.* (2019).

### 2.4.3 Inóculos enzimáticos

Para evitar problemas asociados con la variación y la duración de la actividad del líquido ruminal a lo largo del tiempo, se han desarrollado metodologías enzimáticas que pretenden llegar a eliminar este inóculo microbiano (Clark y Beard, 1977), sobre todo pensando que un inóculo enzimático ofrece una mejor estandarización de la metodología y una reducción a la variación que se pueda atribuir a la fuente y preparación del inóculo (Boever *et al.*, 1986), y que además, contribuye a reducir la dependencia de animales modificados quirúrgicamente como donantes de líquido ruminal.

Algunas desventajas de las enzimas que han sido evaluadas como inóculos, es que al no verse influenciadas por nutrientes suplementarios, no generan datos cinéticos (Aufrere y Michalet-Doreau, 1988). Por otra parte, no proporcionan información relativa de los sustratos metabólicos utilizados por el animal huésped, además de que falta estandarización de enzimas comerciales, lo cual limita su uso como inóculos (Mould *et al.*, 2005).

Se ha evaluado la enzima celulasa como alternativa para no utilizar inóculos, atribuyéndole toda la digestión de alimento a una sola enzima, provocando resultados diferentes a los obtenidos con líquido ruminal (Arce *et al.*, 2003). Además, la actividad de conjuntos enzimáticos se ve influenciada por la temperatura y pH, perdiendo estabilidad enzimática (Meraz-Romero *et al.*, 2012). Es por esto, que los conjuntos enzimáticos solo han sido evaluados para mejorar la digestibilidad de alimentos (Vera-Bravo *et al.*, 2021) y no como inóculo alternativo dentro de la PGIV.

## **2.5 Ácidos grasos volátiles**

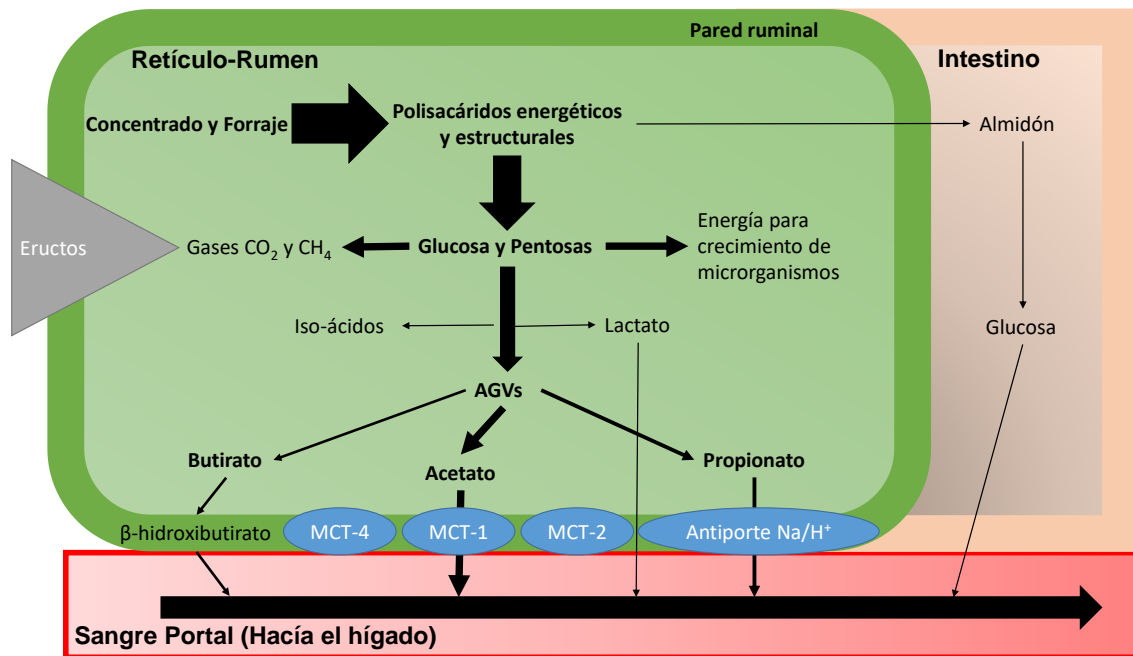
Productos de la fermentación ruminal de alta abundancia son los ácidos grasos volátiles (AGV's), acético, propiónico y butírico (Bharanidharan *et al.*, 2018), productos que representan fuente importante de energía para los rumiantes (McDonald *et al.*, 2011).

Otros productos también obtenidos en la fermentación ruminal son el ácido láctico, ácido succínico, etanol, gases dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), hidrógeno (H<sub>2</sub>) y el ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). Todos estos compuestos se obtienen principalmente de la glucosa o fructosa liberadas de los distintos biopolímeros o por proteínas de la dieta que fermentan las bacterias (Gallegos y Bañuelos, 2019).

De acuerdo a Zavaleta (2013), la fermentación de los aminoácidos valina, leucina, isoleucina y prolina da como resultado la producción de los AGV's isobutirato, isovalerato, 2-metil butirato y valerato. Crosby-Galván y Ramírez-Mella (2018),

reportaron niveles de AGV's en el rumen en estado estable, de 60 mM de acetato, 20 mM de propionato y 10 mM de butirato.

Los AGV's disociados por las bacterias se nombran acetato, butirato y propionato, y son absorbidos a través del epitelio ruminal por difusión simple y facilitada (Figura 3) mediante transportadores monocarboxilatos (MCT-1, MCT-2 y MCT-4), además de intercambiadores antiporte de sodio/protones (Nakamura *et al.*, 2018).

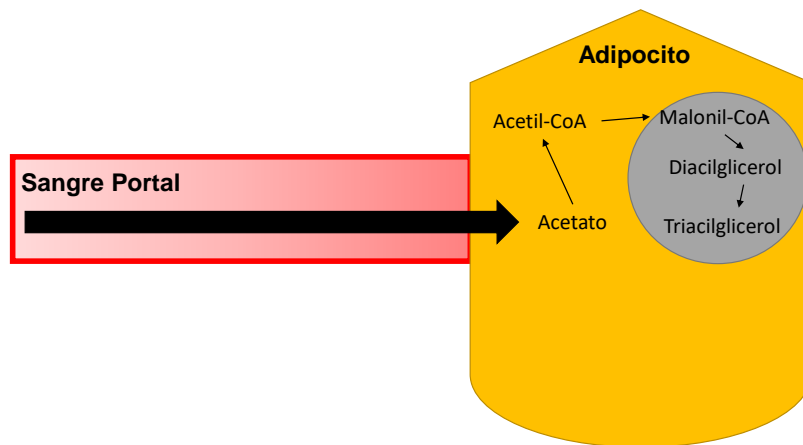


**Figura 3.** Síntesis de ácidos grasos volátiles y su transporte hacia el hígado (Figura del Autor, basado en información de Huertas y Vásquez, 2020).

Posteriormente son oxidados en los diferentes tejidos del animal, constituyendo su principal fuente de energía. Entre el 50-75% de los AGV's pueden ser absorbidos por el epitelio rumino-reticular, el resto se absorben por el omaso e intestino (Storm *et al.*, 2012). En cambio, los productos gaseosos de la fermentación se liberan por el eructo (Madigan *et al.*, 2015).

### 2.5.1 Acetato

Kristensen *et al.* (2005) reportaron que el acetato puede ser utilizado en el metabolismo intermediario en el proceso de la síntesis de grasa, con fines de formar reserva energética en tejidos extra-hepáticos, a donde ingresa por difusión simple o facilitada mediante transportadores (MCT 1 y 4) (Xiang *et al.*, 2016). Cuando el acetato se encuentra en el citoplasma, participa en una reacción catalizada por acetil-CoA sintetasa para producir acetil-CoA (Figura 4), que funge como precursor en el adipocito para iniciar la lipogénesis por la vía malonil-CoA, para entrar al ciclo de Krebs en la mitocondria (Kristensen *et al.*, 2005).

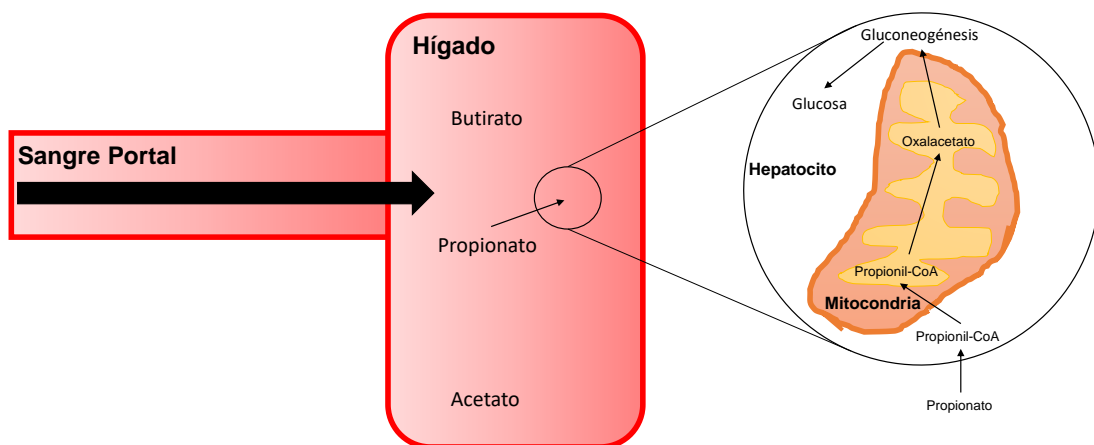


**Figura 4.** Participación del acetato en la lipogénesis (Figura del Autor, basado en información de Huertas y Vásquez, 2020)

Zambell *et al.* (2003) determinaron que la mayor contribución de carbonos para incorporación a ácidos grasos, fue a partir del acetato, además del butirato y el 3-hidroxi butirato.

### 2.5.2 Propionato

El propionato es transportado por el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado; en el citoplasma del hepatocito es carboxilado por la enzima propionil-CoA carboxilasa. De esta forma se incorpora a la matriz mitocondrial y es convertido a metil-malonil-CoA, y enseguida a succinil-CoA, que ingresa al ciclo de Krebs produciendo oxalacetato (Wongkittichote *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). El oxalacetato puede salir de la mitocondria para iniciar la gluconeogénesis por la vía fosfoenol piruvato (PEP) (Engelking, 2015). La producción de ácido propiónico también se puede lograr por vía de la fermentación de glicerol, el cual proviene de las grasas y los galactoglicéridos en las hojas de los vegetales (Figura 5).



**Figura 5.** Vía metabólica del propionato. (Figura del Autor, basado en información de Huertas y Vásquez, 2020).

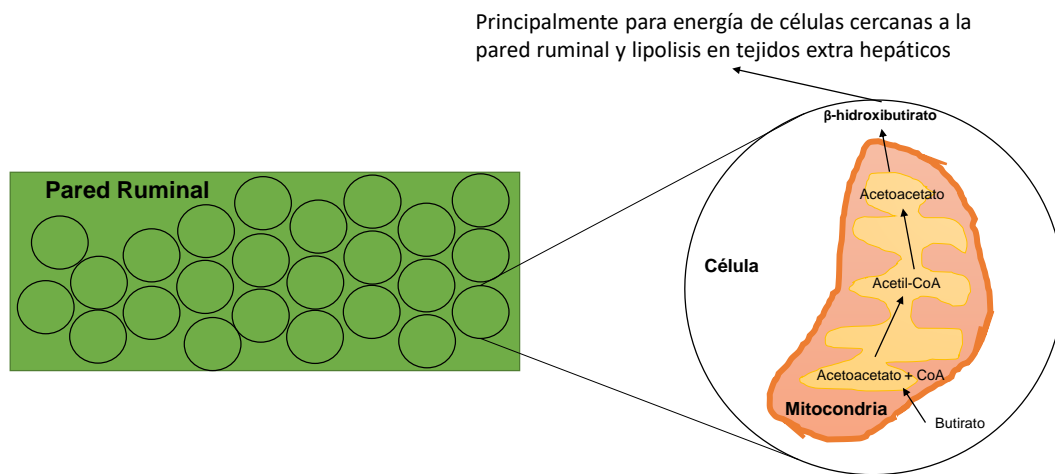
### 2.5.3 Butirato

Durante su difusión, los AGV's pueden ser utilizados por las mitocondrias de células que conforman la pared ruminal y contribuyen a la síntesis de cuerpos cetónicos para brindar energía en forma de compuestos como el beta-hidroxibutirato y el aceto-acetato (Kato *et al.*, 2016). Aproximadamente del 85 al 90% del butirato es absorbido y metabolizado por las células basales de la pared ruminal antes de llegar al torrente sanguíneo.

El butirato es transformado en el citoplasma de la célula a butiril-CoA y posteriormente ser traslocado hacia la mitocondria para su beta-oxidación, y convertido en acetoacetyl CoA por acción de la enzima acetoacetyl CoA tiolasa, para ser utilizado en el ciclo de Krebs (Storm *et al.*, 2012).

Los cuerpos cetónicos se pueden producir por dos vías diferentes: la primer vía es la que inicia con la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de 3-hidroxi-3 metilglutaril CoA sintasa y 3-hidroxi-3 metilglutaril CoA liasa. La segunda vía es a partir de la desacetilacion de acetoacetyl-CoA por la enzima succinil-CoA transferasa (Figura 6). Finalmente, se produce beta-hidroxibutirato, catalizado por beta-hidroxibutirato deshidrogenasa (Bruss, 2008).

(Figura 6).



**Figura 6.** Metabolismo de butirato. (Figura del Autor, basado en información de Huertas y Vásquez, 2020).

## 2.6 Justificación

Para elevar los valores productivos en industrias pecuarias es importante considerar la necesidad de determinar el valor nutricional y energético de los alimentos de animales. Por ello, son necesarios métodos precisos y prácticos para la evaluación del valor nutricional de los forrajes (Posada y Noguera, 2005).

La técnica PGIV, que consiste en analizar la producción de gas resultante de la fermentación de alimentos en líquido ruminal *in vitro*, ha demostrado ventajas al compararlo con otras técnicas, principalmente debido a su robustez, sensibilidad, precisión, tiempo y costos (Storm *et al.*, 2012).

El uso de excretas como inóculo alternativo al líquido ruminal en la técnica de PGIV ha sido evaluado previamente, indicando que podría tener un uso potencial en la técnica de la producción de gas *in vitro*. Sin embargo, se han encontrado discrepancias entre los resultados obtenidos en trabajos previos de investigación (Cone *et al.*, 2002; Váradyová *et al.*, 2005; Posada *et al.*, 2012), por lo que los estudios en este contexto son necesarios para estandarizar y comprender de mejor manera la producción de gas y de AGV's en esta técnica.

Otro aspecto por el que el uso de inóculo a partir de excreta pudiera ser beneficioso, es el bienestar animal, elemento integrante de la calidad global de los alimentos, al que la sociedad otorga cada vez más importancia, no solo por razones éticas, sino también porque problemas de bienestar animal son también problemas productivos o sanitarios, que tienen implicaciones para la salud animal y la seguridad alimentaria (Rymer *et al.*, 2005; Manteca, 2012).

El bienestar de los animales durante la fase experimental de la investigación debe ser considerado, y en ese sentido, el uso de animales fistulados para la toma de muestra de inóculo ruminal puede presentarse como una circunstancia de estrés, pudiendo afectar el bienestar del animal, durante la cirugía y posteriormente. Al existir la excreta como inóculo, es posible reducir el estrés y mejorar el bienestar de los animales experimentales, además de que es posible incrementar el número de



animales en la investigación y asegurar la continuidad de la comprensión de la producción de gas *in vitro*.

### **2.6.1 Planteamiento del problema**

Se evaluará la posibilidad de que las excretas de borrego pueden llegar a sustituir a los animales ovinos fistulados, como fuente de inóculo para incubación de alimentos para determinar producción de gas *in vitro*.

### **2.6.2 Hipótesis**

Las excretas enriquecidas con levadura inactiva de ovinos pueden reemplazar el líquido ruminal como inóculo dentro de la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar el valor nutricional de alimentos.

### **2.6.3 Objetivo general**

Determinar si las excretas con levadura inactivada pueden sustituir al líquido ruminal como inóculo en incubaciones de alimentos *in vitro*.

### **2.6.4 Objetivos específicos**

- Evaluar la composición química de las dietas experimentales.
- Cuantificar la producción de gas *in vitro*, utilizando líquido ruminal y excretas adicionadas con levadura inactivada como inóculo.
- Calcular el contenido de energía y la digestibilidad de la materia orgánica de las dietas, utilizando ambos inóculos.
- Medir la producción y determinar la proporción de ácidos grasos volátiles acético, propiónico y butírico utilizando líquido ruminal y excretas más levadura inactivada como inóculo.

## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Animales donadores de inóculo**

El uso de los animales para investigación fue aprobado por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) (Dictamen No. 015/2021 Folio: 006.2021). Como donadores del inóculo ruminal y excreta para el presente estudio, se utilizaron dos ovinos Saint Croix de 3 años de edad, que previamente habían sido fistulados a la edad de 6 meses por un Médico Veterinario con experiencia previa en cirugía experimental.

Durante la realización del presente estudio, estos dos borregos fueron alojados en el Centro de Exposiciones Agropecuarias (CEAG), ubicado en Francisco Villa s/n, Col. ex Hacienda el Canadá, General Escobedo, N.L., México. Fueron cuidados atendiendo las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-06-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Para el presente estudio, estos dos borregos fueron alimentados con 1.3 kg/día/animal de una dieta con 14% de proteína y 2.25 Mcal EM/kg, a base de 60% heno, 15% heno de alfalfa y 25% de concentrado, con agua a libre acceso.

### **3.2 Dietas experimentales**

Las pruebas para explorar la posibilidad de sustituir el líquido ruminal por excretas como inóculo en incubaciones *in vitro*, se llevaron a cabo en cinco dietas experimentales elaboradas con cinco proporciones de concentrado (C) y forraje (F): 100C:0F; 75C:25F; 50C:50F; 25C:75F; 0C:100F. El concentrado (C) fue formulado con 58% de grano de sorgo molido y 42% harina de soya. El forraje (F) consistió en una mezcla 50% pasto bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) y 50% de pasto Johnson (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), los cuales fueron secados a 60°C para

ser molidos en un molino calidad laboratorio (Thomas Wiley, Philadelphia, U.S.A.) y cribados a partícula de 1 milímetro.

Las dietas experimentales se elaboraron en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la Facultad de Agronomía, UANL, ubicado en el Campus de Ciencias Agropecuarias de la UANL (Calle Francisco I. Madero S/N, Ex Hacienda El Canadá, 66050) en Gral. Escobedo, N.L., México.

### 3.3 Planteamiento experimental

Se llevaron a cabo incubaciones (n=3) en duplicado, de cinco alimentos con las proporciones de C y F señaladas previamente (100C:0F; 75C:25F; 50C:50F; 25C:75F; 0C:100F), utilizando en cada caso el inóculo estándar líquido ruminal (T1), o excretas adicionadas con levadura como inóculo alternativo (T2) para la incubación. Cada uno de los cinco alimentos fue sometido en seis ocasiones a los dos tratamientos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Tratamientos y proporciones de concentrado (C) y forraje (F) a evaluar (n=3).

Tratamientos	Proporción C : F
Inóculo Líquido Ruminal	100:0
	75:25
	50:50
	25:75
	0:100
Inóculo Excreta más Levadura	100:0
	75:25
	50:50
	25:75
	0:100

C: Concentrado, F: Forraje

### 3.4 Composición química de las dietas experimentales

La composición química de las cinco dietas experimentales se determinó por duplicado en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos, de la Facultad de Agronomía, UANL, de acuerdo a la metodología de la AOAC (2005).

#### 3.4.1 Humedad: (método 930.15; AOAC, 2005)

La humedad se obtuvo a partir de la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra, pesando 1 g (división mínima = 0.0001 g) de muestra, para ser desecada en una estufa de aire forzado a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ . Los resultados para obtener el contenido de materia seca (% MS) de la muestra fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$MS(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100$$

$$\text{Humedad}(\%) = 100 - MS(\%)$$

Donde:

- MS (%): cantidad de materia seca en la muestra
- A (g): peso final del recipiente conteniendo la muestra desecada
- B (g): peso del recipiente vacío
- C (g): cantidad de muestra pesada en el ensayo

#### 3.4.2 Cenizas: (método 942.05; AOAC, 2005)

El contenido de cenizas, que equivale al contenido total de minerales (material inorgánico) de la muestra, se midió a partir de la calcinación a  $550^\circ\text{C}$  durante 4 horas, de 1 a 2 g de muestra (división mínima = 0.0001 g) dentro de un crisol de porcelana, utilizando una mufla marca Lindberg (Thermo Scientific ®, Waltham, MA). El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\%Ceniza = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Donde:

Ceniza (%):	cantidad de ceniza en la muestra
A (g):	peso del crisol después de la incineración de la muestra
B (g):	peso del crisol vacío
C (g):	peso inicial de la muestra

### **3.4.3 Grasa: (método 920.39; AOAC, 2005)**

El extracto etéreo se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por ANKOM (2017), obteniendo los triglicéridos presentes en un gramo de muestra previamente desecada y colocada en bolsas filtro XT4 (ANKOM Technology, Macedon, NY), utilizando un extractor de grasa ANKOM XT10, (ANKOM Technology, Macedon, NY). Se utilizó éter de petróleo como solvente para extraer la grasa.

$$\%Grasa = \frac{P2 - P3}{P1} \times 100$$

Donde:

Grasa (%):	cantidad de grasa en la muestra
P1 (g):	peso inicial de la muestra analizada
P2 (g):	peso de la bolsa con la muestra después de secado a 100 °C
P3 (g):	peso de la bolsa vacía con la muestra post- extracción con éter de petróleo

### **3.4.4 Fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina ácido detergente**

Las fracciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinaron en base a los fundamentos de Van Soest *et al.* (1991), utilizando el equipo de ANKOM Technology (2017). Primeramente se pesaron de 0.45-0.50 gramos de muestra (exactitud = 0.0001 g), y se colocaron dentro de bolsas filtrantes F57 (ANKOM Technology, Macedon, NY), las cuales fueron selladas por calor y colocadas en el equipo analizador de fibra ANKOM2000 (ANKOM Technology,

Macedon, NY) en donde se llevó a cabo la cocción de la fibra a 100°C durante una hora con el detergente neutro (Lauril sulfato de sodio). Se realizaron lavados con agua, para eliminar el exceso de detergente; se colocaron en la estufa de secado con la finalidad de eliminar la humedad. Y una vez concluida la determinación de FDN, se procesaron las muestras en forma secuencial con la determinación de FDA. El contenido de lignina se determinó con el método de Lignina Ácido Detergente (LAD), descrito por Ramírez (2007), empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (v/v). Los contenidos de Hemicelulosa (FDN-FDA) y Celulosa (FDA-Lignina) se calcularon por diferencia, como fue descrito por Dryden (2008).

$$FDN, FDA, LAD(\%) = \frac{P3 - (P1 \times C1)}{P2}$$

Donde:

- FDN, FDA, LAD (%): fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina ácido detergente
- P1 (g): peso inicial de la bolsa filtrante
- P2 (g): peso inicial de la muestra
- P3 (g): peso de la bolsa seca con la fibra después del proceso de cocción de la fibra
- C1 (adimensional): corrección bolsa blanco (Peso promedio de bolsa blanco después del proceso seca / peso original de la bolsa blanco)

### **3.4.5 Proteína cruda**

Se determinó el contenido de proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl, utilizando un bloque de digestión, en el que la muestra fue digerida a 400°C con ácido sulfúrico concentrado (98%;v/v) y una mezcla catalizadora (97% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 3% CuSO<sub>4</sub>). Posteriormente la muestra digerida se diluyó en agua, se añadió hidróxido de sodio (100 ml al 40%), el nitrógeno liberado durante la destilación es capturado en 100 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 4% v/v. Por último, se realizó una titulación al nitrógeno destilado con ácido clorhídrico (0.1 N).

El método cuantifica nitrógeno total (N) de la muestra y mediante un factor de conversión fue expresado en términos de proteína cruda (Navarro y Roa, 2020).

$$\%Nitrógeno = \frac{V \times meqN \times NHCl}{P} \times 100$$

$$\%PC = \%Nitrógeno \times 6.25$$

Donde:

V (ml): volumen de HCl utilizado para titular la muestra

meqN: miliequivalente de Nitrógeno

NHCl: Normalidad de la solución de HCl

P (g): peso de la muestra

### 3.5 Determinación de la producción de gas *in vitro* (PGIV)

El líquido ruminal fue colectado el día de la incubación, antes de la alimentación matutina, por la fístula ruminal del animal, utilizando una bomba de vacío operada manualmente. Fue transferido al laboratorio en un termo precalentado a  $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , purgado con  $\text{CO}_2$ . Fue filtrado a través de 4 capas de gasa, para ser mezclado con la saliva artificial McDougall a una relación de 1:2 (v/v). Este inóculo finalmente fue transferido en no más de 30 minutos después de haber sido colectado, a jeringas de vidrio para incubación, graduadas, de 100 ml de capacidad (división mínima 1 ml), en donde se había colocado previamente la muestra de alimento (Váradyová *et al.*, 2005).

Excretas frescas fueron obtenidas directamente del recto de ovejas desde el día previo a la incubación y fueron transportadas en un termo precalentado y purgado con  $\text{CO}_2$  a una temperatura de  $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Para elaborar el inóculo a partir de excreta con levadura, las excretas se homogenizaron y purgaron con  $\text{CO}_2$ , y se colocaron en una dilución de 20 g de heces en 120 ml de solución tampón (Aiple *et al.*, 1992). Se adicionaron 5 g de levadura inactivada de *Saccharomyces cerevisiae* (PlassYeast, Plasset Ingredients, México), y esta solución se mantuvo a  $39^\circ\text{C}$

durante 24 horas antes de la incubación. Inmediatamente antes de la incubación, las excretas con levadura se filtraron con 4 gasas y este filtrado fue disuelto en 2 volúmenes de saliva artificial McDougall, para ser utilizado como inóculo (Váradyová *et al.*, 2005; Posada *et al.*, 2012).

La PGIV se determinó por la metodología de Menke y Steingass (1988), utilizando el sistema de jeringas de vidrio graduadas a 100 ml (Fortuna®, Häberle Labortechnik, Alemania). Se utilizaron 30 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de saliva artificial y el inóculo correspondiente, para incubar 200 mg de muestras de alimento molidas y cribadas a partícula de 1 mm. La saliva artificial fue elaborada con una solución buffer a base de bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio y solución nutritiva (Melesse *et al.*, 2017). Las muestras se incubaron a 39°C y la producción de gas se midió a 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h. La producción de gas fue corregida considerando un control que consistía en el inóculo sin muestra. Además, para tomar en cuenta la actividad de fermentación de cada inóculo se utilizó un forraje estándar (alfalfa) para corregir la producción de gas entre incubaciones.

### **3.6 Modelos de Regresión Lineal Simple (RLS) y Regresión Polinómica (RPOL)**

A partir de la PGIV obtenida con líquido ruminal y excretas adicionadas con levadura como inóculos a las 24 horas, se generaron modelos de regresión lineal simple (RLS) y regresión polinómica (RPOL). Se calcularon sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ), y con las ecuaciones generadas, se estimó la PGIV que se podría haber obtenido si su hubiera tenido líquido ruminal como inóculo, a partir de los datos de producción de gas registrada al utilizar las excretas adicionadas con levadura como inóculo.



### 3.7 Modelo Gompertz

Se utilizó el modelo de Gompertz (Bachmann *et al.*, 2022), para ajustar la producción de gas registrada con ambos inóculos (líquido ruminal y excretas adicionadas con levadura inactivada), hasta el tiempo de 24 horas.

$$PG(t) = A * e^{-B * e^{-kt}}$$

Donde:

PG (t) (ml/ 200 mg MS): producción de gas en función del tiempo (t = 0, 3,...,24) en horas

A (ml/ 200 mg MS): producción de gas asintótico máxima cuando el tiempo llega a infinito

B (adimensional): parámetro de escala (constante de integración), que está relacionado con los valores iniciales de producción de gas

K (adimensional): tasa relativa de producción de gas

e (adimensional): número Euler o base del logaritmo natural (2.71828)

### 3.8 Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO)

Utilizando la fórmula propuesta por Menke y Steingass (1988), fue estimada la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) del alimento incubado, a partir de la producción de gas *in vitro* a las 24 horas. En esta ecuación se consideran, además de la PGIV, el contenido de proteína cruda y de cenizas de la dieta evaluada:

$$DIVMO (\%) = [0.889(PG24h) + 0.448(PC) + 0.651(Cen) + 14.88]$$

Donde:

DIVMO (%):	digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
PG24h (ml/200mg MS):	producción de gas a las 24 horas de incubación
PC (% MS):	contenido de proteína cruda
Cen (% MS):	contenido de cenizas

### 3.9 Contenido de energía metabolizable (EM)

El contenido de energía metabolizable de las muestras incubadas de alimento fue estimado a partir de la producción de gas *in vitro* registrada a las 24 horas de incubación, considerando además el contenido de proteína cruda, contenido de extracto etéreo y contenido de ceniza de cada una de las correspondientes muestras analizadas. Se utilizaron las ecuaciones propuestas por Menke y Steingass (1988), que consideran una ecuación para las muestras de forrajes y otra para las muestras de los suplementos.

Para los forrajes se utilizó la siguiente fórmula (Menke y Steingass, 1988):

$$EM(\text{MJ/kg MS}) = 2.20 + 0.136(PG24h) + 0.057(PC) + 0.0029(Grasa^2)$$

Para los alimentos con alta proporción de concentrados se utilizó la siguiente fórmula (Menke y Steingass, 1988):

$$EM(\text{MJ/kg MS}) = 1.06 + 0.157(PG24h) + 0.084(PC) + 0.22(Grasa) - 0.081(Cen)$$

Donde:

EM (MJ/kg MS):	energía metabolizable
PG24h (ml/200mg MS):	producción de gas a las 24 horas de incubación
PC (% MS):	contenido de proteína cruda
Grasa (% MS):	contenido de extracto etéreo
Cen (% MS):	contenido de cenizas

### **3.10 Determinación de la cantidad de ácidos grasos volátiles**

El contenido de ácidos grasos volátiles (AGV's) se determinó utilizando la metodología descrita originalmente por Reyna-Gómez et al. (2021), en la que muestras de 10 ml se colectaron de las jeringas de vidrio en las que se llevó a cabo la técnica de producción de gas *in vitro*, al finalizar la incubación a las 24 h. Las muestras se centrifugaron a 6,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró (Syringe Filter, Whatman Uniflo™) y se colocaron 1.2 ml de la muestra correspondiente, así como 0.3 ml de solución de ácido metafosfórico 25% (p/v), en viales (Vial Crimp, 2ml, Agilent Technologies, USA) sellados manualmente (Manual Crimper, 11mm, Agilent Technologies, USA).

Estas muestras se analizaron en un cromatógrafo de gas (Agilent Technologies® modelo 7820 A, USA) equipado con detector de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar HP-INNOWAX (50 m x 0.2 mm x 0.4 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El gas aplicado como transportador fue Argón.

Para el análisis del presente trabajo, el horno se configuró con un método de rampa de calentamiento de 70 a 180°C, a razón de 10°C min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector y del analizador se mantuvo en 250°C.

Las concentraciones de AGV's individuales en la muestra se calcularon empleando curvas de calibración generadas al emplear diluciones seriadas de ácido acético, propiónico y butírico, utilizando estándares de Sigma Aldrich®, donde en cada vial se colocaron 1.2 ml de agua bidestilada, 0.3 ml de ácido metafosfórico 25% (p/v) y los tres ácidos para cada concentración conocida.

### **3.11 Determinación de la proporción de ácidos grasos volátiles**

A partir de las concentraciones obtenidas de ácido acético, propiónico y butírico para cada tipo de inóculo y dieta (n=2), se determinaron las proporciones molares, sugiriendo que estos tres AGV's contemplan la totalidad presente en la muestra.

### 3.12 Análisis estadístico

La composición química de las dietas elaboradas con el fin de ser evaluadas en incubaciones *in vitro* (contenido de materia seca, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, NDF, ADF, celulosa, hemicelulosa, lignina) fue analizada de acuerdo a un modelo completamente al azar de 5 dietas con tres repeticiones por dieta, utilizando el paquete estadístico IBM SPSS® Statistics versión 23.

Los resultados de producción de gas *in vitro*, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y contenido de energía metabolizable obtenidos de las incubaciones de las dietas experimentales evaluadas con los dos inóculos, se analizaron mediante el modelo estadístico análisis de varianza con arreglo factorial 2 x 5 con dos inóculos (líquido ruminal y excretas) en cinco dietas con diferentes proporciones de forraje:concentrado (n=8 determinaciones por inóculo (tratamiento)). Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas con la prueba de Tukey, a un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS® Statistics versión 23 para la realización de la evaluación.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composición química de las dietas experimentales

Al determinar la composición química de las dietas experimentales se observó un mayor contenido de proteína cruda y extracto etéreo en dietas altas en concentrado (100C:0F y 75C:25F). Se observaron también contenidos mayores de proteína (desde 10.28% hasta 28.06%; Cuadro 4), y de grasa cruda (desde 1.39% hasta 2.74%), al incrementar la proporción de concentrado de las dietas experimentales. Los parámetros relacionados con la cantidad de fibra como FDN, FDA, LAD, hemicelulosa, celulosa, además de las cenizas, presentaron valores tendencialmente mayores al disminuir la proporción de concentrado en la dieta y/o al aumentar la proporción de forraje.

**Cuadro 4.** Composición química de las dietas.

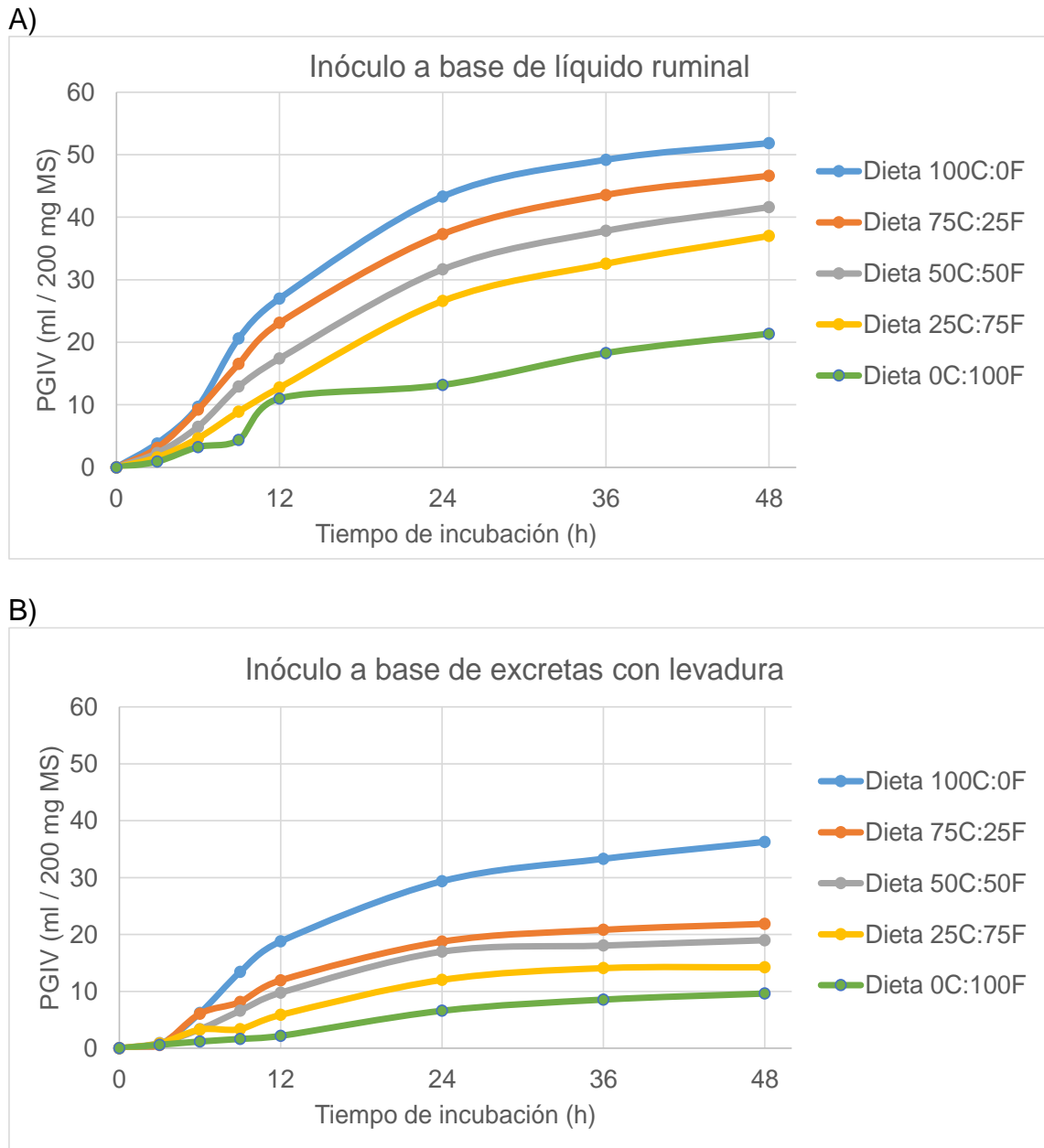
Parámetro (base MS)	Dieta				
	100C:0F	75C:25F	50C:50F	25C:75F	0C:100F
PC (%)	28.06	24.78	18.25	15.63	10.28
EE (%)	2.74	1.42	1.75	1.68	1.39
FDN (%)	13.79	29.83	43.47	56.29	67.94
FDA (%)	4.17	15.05	23.94	33.24	42.74
LAD (%)	0.09	0.70	1.23	1.21	1.64
Hemicelulosa (%)	9.63	14.77	19.53	23.05	25.20
Celulosa (%)	4.07	14.35	22.70	25.20	41.10
Cenizas (%)	4.77	6.89	7.97	9.64	11.03

MS: Materia seca, PC: Proteína cruda, EE: Extracto etéreo, FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido, LAD: Lignina ácido detergente.

### 4.2 Producción de gas *in vitro*

La cantidad de gas producida en la incubación fue proporcional a la cantidad de concentrado en la dieta para ambos inóculos evaluados (Figura 7). Al utilizar el líquido ruminal como inóculo, la producción de gas máxima registrada a las 48 horas fue en la dieta 100C:0F (51.5 ml/200 mg MS) y la mínima en la dieta 0C:100F (21.1 ml/200 mg MS; Figura 7.A).

La producción de gas más alta registrada a las 48 h, al utilizar el inóculo de excretas con levadura fue en la dieta 100C:0F (36.3 ml/200 mg MS a las 48 horas), mientras que la menor fue en la dieta 0C:100F (8.8 ml/200 mg MS a las 48 horas; Figura 7.B).



**Figura 7.** PGIV a 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h de incubación en dietas con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F). A) Inóculo de líquido ruminal. B) Inóculo de excretas con levadura.

La producción de gas *in vitro* (PGIV) registrada con el inóculo estándar (líquido ruminal) fue mayor que la registrada para el inóculo alternativo (excretas con levadura) en las cinco dietas experimentales evaluadas ( $P < 0.05$ ), en los tiempos 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h. La fase lag fue mayor en la incubación con excretas con levadura que con líquido ruminal.

Al comparar la PGIV de excretas con levadura como inóculo alternativo a las 24, 36 y 48 h (Cuadro 5), se observa que la PGIV a las 48 h de las dietas 100C:0F y 0C:100F al utilizar excretas con levadura como inóculo fueron similares a lo encontrado con líquido ruminal a las 24 h ( $P > 0.05$ , Cuadro 5). La producción de gas de las dietas restantes no alcanzó niveles de producción de gas similares ( $P < 0.05$ ) a los registrados con líquido ruminal a las 24 h, que fueron considerados como inóculo y tiempo estándar de referencia (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Producción de gas *in vitro* (PGIV) al utilizar líquido ruminal a las 24 h y excretas con levadura a las 24, 36 y 48 h como inóculos (n=3).

Dieta	Inóculo				Estadísticos	
	Líquido ruminal	Excretas con levadura			EEM	Valor P
	PGIV 24 h	PGIV 24 h	PGIV 36 h	PGIV 48 h		
100C:0F	43.3 <sup>a</sup>	9.3 <sup>b</sup>	33.3 <sup>b</sup>	36.3 <sup>ab</sup>	1.802	0.001
75C:25F	37.3 <sup>a</sup>	18.7 <sup>b</sup>	20.8 <sup>b</sup>	21.9 <sup>b</sup>	1.546	0.001
50C:50F	31.6 <sup>a</sup>	16.9 <sup>b</sup>	18.0 <sup>b</sup>	19.0 <sup>b</sup>	1.198	0.001
25C:75F	26.6 <sup>a</sup>	11.6 <sup>b</sup>	13.8 <sup>b</sup>	16.6 <sup>b</sup>	1.365	0.001
0C:100F	13.2 <sup>a</sup>	6.1 <sup>b</sup>	7.8 <sup>b</sup>	8.8 <sup>ab</sup>	1.210	0.005

C: Concentrado, F: Forraje, PGIV: Producción de gas *in vitro*, EEM: Error estándar de la media. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

Aplicando regresión lineal simple (RLS), regresión polinómica (RPOL) y por un factor de corrección (FC), se obtuvieron las ecuaciones (modelos predictivos) mostrados en el Cuadro 6, para estimar la PGIV registrada para el líquido ruminal a 24 h, a partir de la PGIV de las excretas con levadura a las 24 h, para las cinco dietas experimentales.

Los valores obtenidos de Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) de 0.887 en la regresión polinómica para dietas con 100C:0F y de 0.722 para dietas con forraje (Cuadro 6). Los valores de  $R^2$  obtenidos al estimar la PGIV del inóculo líquido ruminal con regresión lineal simple a partir de los datos de PGIV obtenida con excretas como inóculo, fueron 0.886 para dietas con 100C:0F y 0.637 para dietas con forraje (Cuadro 6).

Los valores altos de  $R^2$  obtenidos, indican que es posible utilizar estas ecuaciones para estimar la PGIV obtenida con el inóculo estándar de líquido ruminal a las 24 h a partir de los datos de PGIV generados con excretas adicionadas con levadura como inóculo.

**Cuadro 6.** Modelos predictivos de PGIV de líquido ruminal (y) a partir de PGIV de excretas con levadura (x).

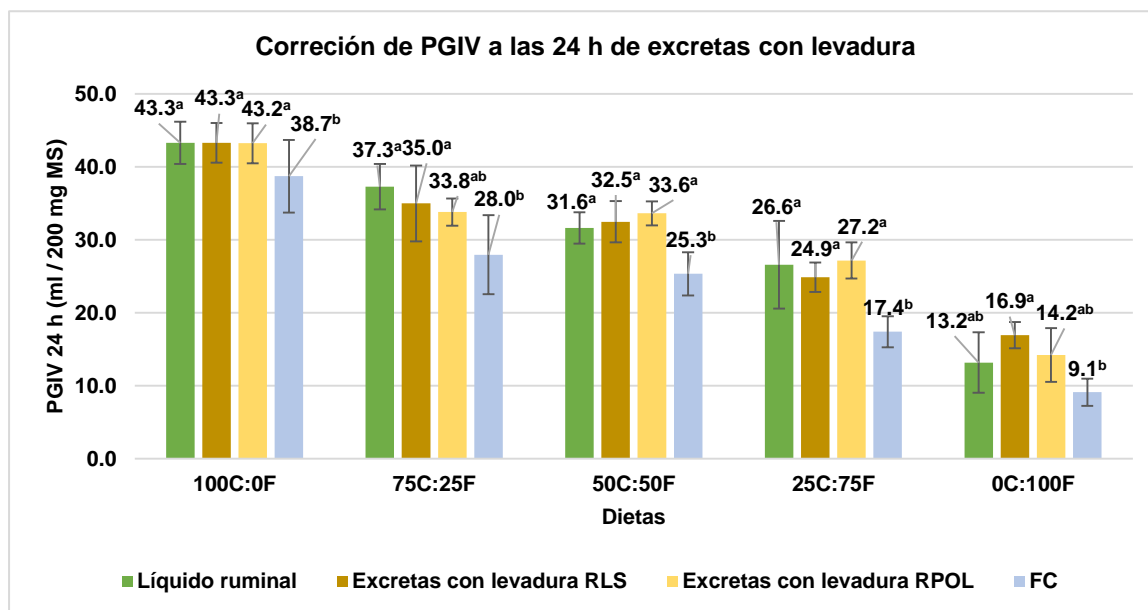
Modelo predictivo	Tipo de alimento	Ecuación	$R^2$
RLS	Concentrado	$y = -0.7229x + 64.469$	0.886
	Forraje	$y = 1.4325x + 8.2066$	0.637
RPOL	Concentrado	$y = -0.0116x^2 - 0.0256x + 54.092$	0.887
	Forraje	$y = -0.1007x^2 + 4.1297x - 7.0926$	0.722
FC	Concentrado	$y = 1.322x$	-
	Forraje	$y = 1.4955x$	-

RLS: Regresión Lineal Simple, RPOL: Regresión Polinómica, FC: Factor de Corrección,  $R^2$ : Coeficiente de determinación.

En la Figura 8 se observa que al estimar la PGIV de líquido ruminal aplicando las ecuaciones generadas a partir de los datos de PGIV con excretas, la mejor estimación de la PGIV real del líquido ruminal fue obtenida con la ecuación polinómica.



La estimación obtenida con la regresión lineal simple mostro un buen ajuste, ya que la PGIV obtenida a partir de regresión polinómica y simple no presentan diferencias en cada una de las dietas experimentales ( $P > 0.05$ ), mientras que la generada con el factor de corrección fue menos buena (Figura 8), ya que sus estimaciones de PGIV fueron diferentes en las dietas 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F y 0C:100F ( $P < 0.05$ ).



**Figura 8.** Producción de gas *in vitro* (PGIV) a 24 h utilizando líquido ruminal como inóculo, y estimaciones de PGIV utilizando un modelo regresión lineal simple (RLS) o un modelo polinómico (RPOL) o un factor de corrección (FC), calculados a partir de la producción de gas de excretas con levadura para cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C). Superíndices distintos, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en cada dieta.

### 4.3 Energía metabolizable

Al estimar el contenido de energía metabolizable a partir de la PGIV estimada utilizando los modelos de RLS, RPOL y FC, los modelos de RLS y RPOL fueron superiores al FC, ya que los valores del contenido de energía calculados con la producción de gas registrada con excretas como inóculo fueron similares ( $P > 0.05$ ; Cuadro 7) a los valores obtenidos con el líquido ruminal (inóculo estándar).

**Cuadro 7.** Estimación del contenido de energía metabolizable (Mcal/kg), utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h.

Dieta	Líquido Ruminal	RLS	RPOL	FC	EEM	Valor P
100C:0F	2.49	2.493	2.491	2.322	0.053	0.084
75C:25F	2.088 <sup>a</sup>	2.005 <sup>a</sup>	1.962 <sup>ab</sup>	1.750 <sup>b</sup>	0.062	0.007
50C:50F	1.775 <sup>a</sup>	1.804 <sup>a</sup>	1.845 <sup>a</sup>	1.554 <sup>b</sup>	0.034	0.001
25C:75F	1.570 <sup>a</sup>	1.513 <sup>a</sup>	1.590 <sup>a</sup>	1.261 <sup>b</sup>	0.049	0.001
0C:100F	1.10 <sup>ab</sup>	1.226 <sup>a</sup>	1.137 <sup>ab</sup>	0.971 <sup>b</sup>	0.043	0.006

RLS: Regresión lineal simple, RPOL: polinómico, FC: Factor de corrección. EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

### 4.4 Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

La DIVMO calculada con las ecuaciones de regresión (RLS y RPOL) generadas, fueron similares a los calculados con la PGIV registrada con líquido ruminal como inóculo (Cuadro 8).

En cambio, para las estimaciones de DIVMO calculadas con la PGIV estimada utilizando un FC, solamente en la dieta 100C:0F ( $P = 0.100$ ), mientras que en las dietas restantes (75C:25F, 50C:50F, 25C:75F, 0C:100F) los valores estimados presentaron diferencias ( $P < 0.007$ ) con el valor de DIVMO calculado utilizando la producción de gas registrada con el líquido ruminal (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Estimación del contenido de digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (%), utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h.

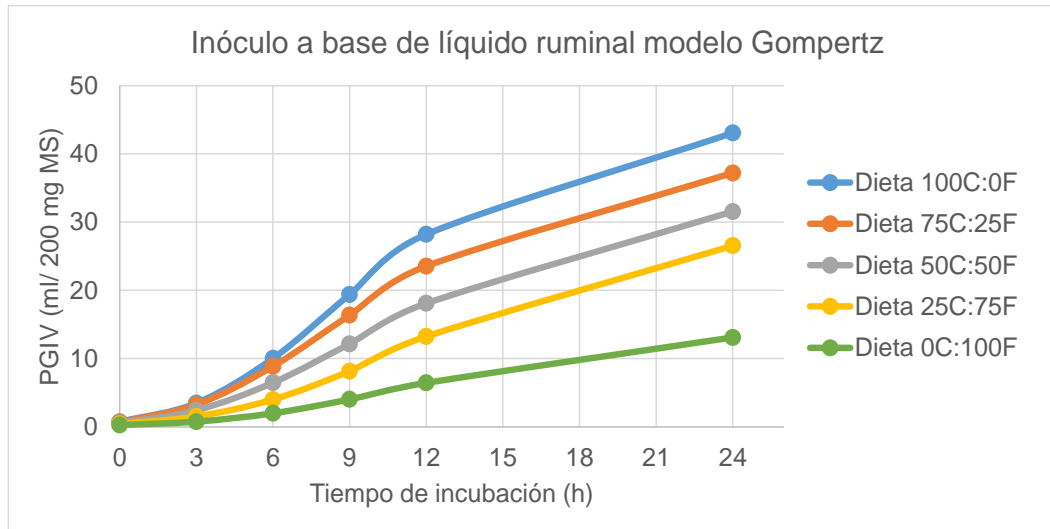
Dieta	Líquido Ruminal	RLS	RPOL	FC	EEM	Valor P
100C:0F	69.042	69.043	69.005	64.988	1.309	0.100
75C:25F	63.611 <sup>a</sup>	61.578 <sup>a</sup>	60.523 <sup>ab</sup>	55.329 <sup>b</sup>	1.516	0.007
50C:50F	56.366 <sup>a</sup>	57.116 <sup>a</sup>	58.153 <sup>a</sup>	50.770 <sup>b</sup>	0.860	0.001
25C:75F	51.795 <sup>a</sup>	50.281 <sup>a</sup>	52.312 <sup>a</sup>	43.637 <sup>b</sup>	1.315	0.001
0C:100F	38.659 <sup>ab</sup>	42.013 <sup>a</sup>	39.592 <sup>ab</sup>	35.059 <sup>b</sup>	1.141	0.005

RLS: Regresión lineal simple, RPOL: polinómico, FC: Factor de corrección. EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

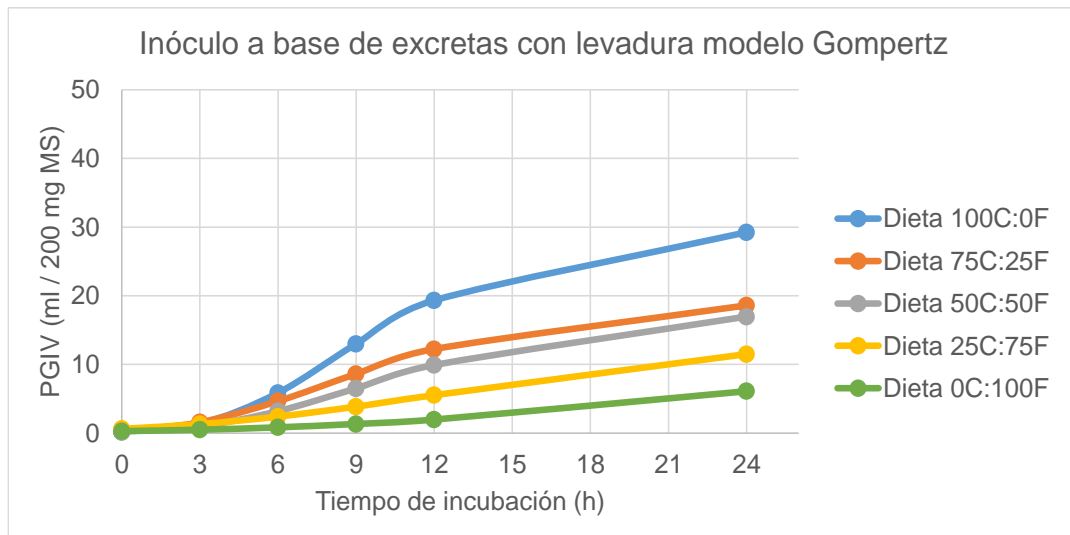
#### 4.5 Producción de gas *in vitro* ajustada con modelo Gompertz

En el presente trabajo también se exploró la conveniencia de ajustar los datos originales (“crudos”) de PGIV para cada inóculo (líquido ruminal y excretas con levadura), utilizando el modelo de Gompertz. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

A)



B)



**Figura 9.** PGIV a 3, 6, 9, 12 y 24 de incubación, en dietas con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F), ajustado con el modelo de Gompertz. A) Inóculo de líquido ruminal. B) Inóculo de excretas con levadura.

La dieta que presentó mayor producción de gas a las 24 h en cada inóculo fue la dieta alta en concentrado (100C:0F) ( $P < 0.05$ ), con una producción acumulada en líquido ruminal de 43.1 ml / 200 mg MS (Figura 9.A) y de 29.2 ml / 200 mg MS cuando el inóculo utilizado fue el de excretas con levadura (Figura 9.B).

En cada una de las dietas evaluadas (con sus respectivas proporciones de C y F), las mediciones de producción de gas a las 24 h corregida por el modelo Gompertz, fue similar ( $P > 0.05$ ) a la registrada originalmente (Valores crudos) en ambos inóculos evaluados. Los datos ajustados por el modelo Gompertz mostraron una cinética de producción de gas similar para ambos inóculos, en las dietas evaluadas con diferente proporción de concentrado en la dieta (Figura 9). La fase Lag fue mayor en dietas con alta proporción de forraje (Figura 9), y también al utilizar excretas con levadura como inóculo (~3 h).

**Cuadro 9.** Producción de gas *in vitro* (PGIV), ajustado con el modelo de Gompertz al utilizar líquido ruminal y excretas con levadura a las 24 h, como inóculos (n=3).

Dieta	Inóculo		Estadísticos	
	Líquido ruminal PGIV 24 h	Excretas con levadura PGIV 24 h	EEM	Valor P
100C:0F	43.1 <sup>a</sup>	29.2 <sup>b</sup>	1.379	0.001
75C:25F	37.2 <sup>a</sup>	18.6 <sup>b</sup>	1.393	0.001
50C:50F	31.5 <sup>a</sup>	16.9 <sup>b</sup>	0.859	0.001
25C:75F	26.5 <sup>a</sup>	11.5 <sup>b</sup>	1.779	0.001
0C:100F	13.1 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>	1.387	0.007

C: Concentrado, F: Forraje, PGIV: Producción de gas *in vitro*, EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ).

La dieta con la más alta proporción de forraje (0C:100F) registró la menor ( $P < 0.05$ ) producción de gas acumulada a las 24 h. La producción de gas al utilizar líquido ruminal fue 13.1 ml / 200 mg MS, mientras que al utilizar excretas con levadura como inóculo, se tuvo una producción de 6.0 ml / 200 mg MS (Cuadro 9).

El hecho de que la cinética de producción de gas de ambos inóculos sea similar con las dietas experimentales evaluadas permite explorar la posibilidad de correlacionar las producciones de gas acumuladas a las 24 h.

Utilizando los datos ajustados por el modelo Gompertz para generar ecuaciones de regresión, utilizando valores de PGIV a las 24 h de excretas con levadura como variable independiente, y la PGIV obtenida a las 24 h de la incubación con líquido ruminal como variable dependiente, se generan ecuaciones de regresión lineal simple (RLS) y regresión polinómica (RPOL; Cuadro 10), que tuvieron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para RPOL de 0.785 y para RLS de 0.664.

**Cuadro 10.** Modelos predictivos de PGIV de líquido ruminal a las 24 h (y) a partir de PGIV de excretas con levadura a las 24 h (x).

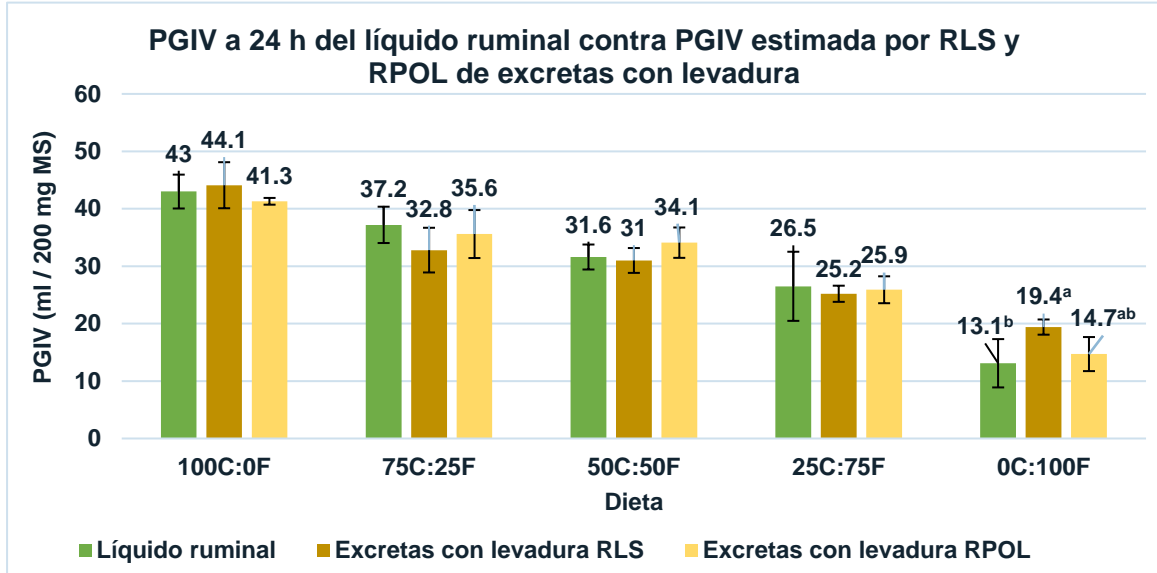
Modelo predictivo	Ecuación	$R^2$
RPOL	$y = - 0.051x^2 + 2.9765x - 1.5141$	0.785
RLS	$y = 1.067x + 12.911$	0.664

RLS: Regresión lineal simple, RPOL: Regresión polinómica,  $R^2$ : Coeficiente de determinación

Al utilizar las ecuaciones de RLS y RPOL con los datos de PGIV obtenidos con excretas como inóculo, fue posible estimar la producción de gas acumulada a las 24 h obtenida con el líquido ruminal (Figura 10).

La producción de gas acumulada a las 24 h de las dietas 100C:0F, 75C:25F, 50C:50F y 25C:75F estimada con las ecuaciones de RLS y RPOL a partir de las incubaciones con excretas con levadura fue similar ( $P > 0.05$ ), a la obtenida de incubaciones con líquido ruminal (Figura 10).

Para la dieta con la más alta proporción de forraje (0C:100F), la PGIV estimada a partir de RLS fue diferente ( $P < 0.05$ ) a la calculada con el líquido ruminal. Sin embargo, la estimación a partir de RPOL se mantuvo aun similar ( $P > 0.05$ ), por lo que la ecuación RPOL se estableció como el modelo de predicción para la producción de gas acumulada a las 24 h con más similitud, a lo obtenido con el líquido ruminal (Figura 10).



**Figura 10.** Producción de gas *in vitro* (PGIV) a 24 h utilizando líquido ruminal y las estimaciones de PGIV utilizando excretas con levadura como inóculos, y un modelo regresión lineal simple (RLS) o un modelo polinómico (RPOL) o un factor de corrección (FC), generados en el presente estudio. Superíndices distintos indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en cada dieta.

#### 4.6 Energía metabolizable a partir de PGIV con Gompertz

Para las cinco dietas experimentales, el contenido de energía metabolizable (EM; Mcal/kg MS) estimado utilizando las ecuaciones RPOL y los valores de PGIV ajustados por Gompertz de la incubación con excretas como inóculo, fue similar ( $P > 0.05$ ) al calculado utilizando los valores de PGIV obtenidos con líquido ruminal (Cuadro 11).

Para la dieta con la más alta proporción de forraje (0C:100F), el contenido de EM calculado a partir de PGIV de excretas con levadura, ajustada por Gompertz y utilizando la ecuación RLS fue mayor ( $P < 0.05$ ) al calculado con la PGIV registrada con el líquido ruminal como inóculo (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Contenido de energía metabolizable (Mcal/kg), calculado valores de PGIV estimadas con ecuaciones de predicción (RLS, RPOL) para cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, y con líquido ruminal a las 24 h.

Dieta	Líquido Ruminal	RLS	RPOL	EEM	Valor P
100C:0F	2.484	2.524	2.419	0.046	0.290
75C:25F	2.084	1.923	2.028	0.056	0.156
50C:50F	1.772	1.753	1.862	0.032	0.064
25C:75F	1.569	1.523	1.547	0.053	0.831
0C:100F	1.101 <sup>b</sup>	1.306 <sup>a</sup>	1.152 <sup>ab</sup>	0.043	0.015

C: Concentrado, F: Forraje, RLS: Regresión lineal simple, RPOL: polinómico, EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

#### 4.7 Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica a partir de PGIV con Gompertz

La digestibilidad *in vitro* (%) de la materia orgánica (DIVMO), calculada para las cinco dietas experimentales, fue similar si se utilizó el inóculo e líquido ruminal o si se estimó a partir de PGIV de excretas con levadura ajustadas con RPOL ( $P > 0.05$ ; Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO, %), obtenida utilizando ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) establecidas a partir de relacionar la producción de gas de cinco dietas con proporciones contrastantes de forraje (F) y concentrado (C), incubadas en excretas con levadura, con la producción de gas utilizando líquido ruminal a las 24 h.

Dieta	Líquido Ruminal	RLS	RPOL	EEM	Valor P
100C:0F	68.827	69.772	67.286	1.173	0.344
75C:25F	63.529	59.583	62.146	1.367	0.152
50C:50F	56.285	55.810	58.580	0.819	0.066
25C:75F	51.750	50.547	51.183	1.404	0.834
0C:100F	38.603 <sup>b</sup>	44.213 <sup>a</sup>	39.996 <sup>ab</sup>	1.148	0.012

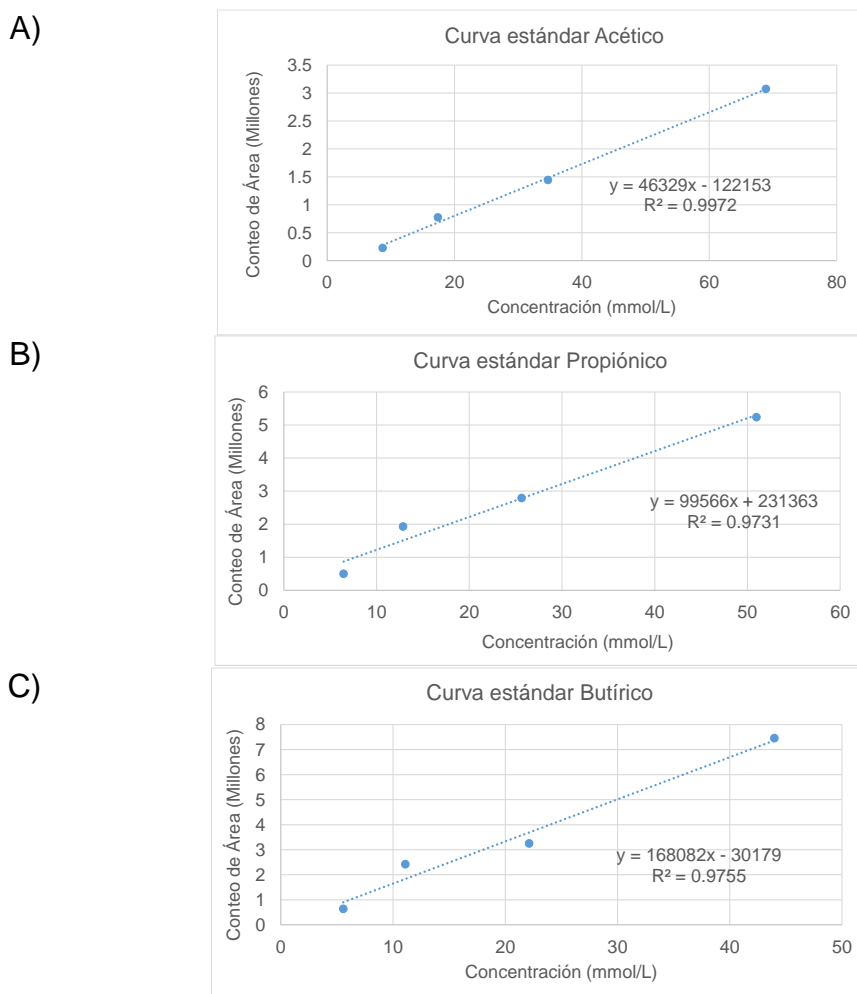
C: Concentrado, F: Forraje, RLS: Regresión lineal simple, RPOL: polinómico, FC: Factor de corrección. EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

La DIVMO en la dieta sin concentrado (0C:100F) estimada con RLS a partir de excretas con levadura fue mayor ( $P < 0.05$ ) a la DIVMO obtenida con líquido ruminal (Cuadro 12).



## 4.8 Ácidos Grasos Volátiles

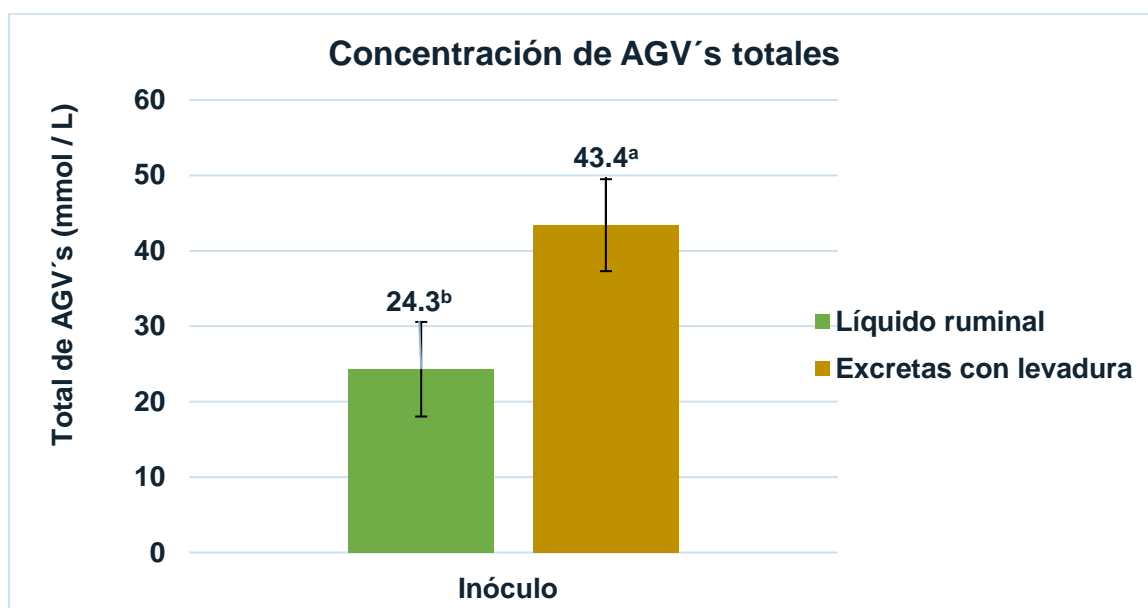
Utilizando el cromatógrafo de gas se pudo determinar el área bajo la curva de los picos resultantes de la detección de los tres ácidos grasos (acético, propiónico y butírico) contenidos en el inóculo de las incubaciones de las muestras analizadas. Con el fin de poder cuantificar la concentración de los ácidos grasos volátiles a partir de las áreas bajo la curva de los picos del cromatograma, se establecieron diluciones de estándares de los tres ácidos grasos en diferentes niveles y disueltos en agua. La relación entre la concentración de la muestra estándar y su área bajo la curva fue utilizada para establecer las ecuaciones de regresión (Figura 11) que nos permitieran cuantificar la concentración de los tres ácidos grasos en las muestras incubadas.



**Figura 11.** Curvas de Calibración para AGV's. A) Curva estándar de acético. B) Curva estándar de propiónico. C) Curva estándar de butírico.

En la Figura 11, se observan las curvas de calibración para los AGV's acético, propiónico y butírico, al relacionar el conteo de área (Millones) con la concentración (mmol/L). Los valores de  $R^2$  para acético fueron de 0.9972 (Figura 11.A), para propiónico 0.9731 (Figura 11.B) y para butírico 0.9755 (Figura 11.C).

Al evaluar la concentración total de AGV's para líquido ruminal y excretas con levadura como inóculos en cinco dietas (100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F, 0C:100F), se observó mayor concentración de AGV's al utilizar excretas con levadura como inóculo durante la técnica de PGIV a las 24 h ( $P < 0.05$ ). La concentración total de AGV's al utilizar excretas con levadura como inóculo fue 43.4 mmol/L, mientras que para el líquido ruminal fue de 24.3 mmol/L (Figura 12).



**Figura 12.** Concentración de ácidos grasos volátiles total en cada inóculo evaluado. AGV's: Ácidos grasos volátiles. Superíndices distintos indican diferencias entre inóculos.

La proporción de ácido acético resultante de las incubaciones con excretas más levadura en las dietas con proporción de concentrado mayor de 75% (100C:0F y 75C:25F), fue mayor ( $P < 0.05$ ) a la proporción registrada de las incubaciones con

líquido ruminal. Sin embargo estas diferencias de proporciones de ácido acético no se observaron en las dietas con 50% o más de forraje (Cuadro 13).

En las incubaciones con líquido ruminal se registraron mayores proporciones de ácido propiónico que en las incubaciones con excretas con levadura como inóculo, en dietas altas en concentrado (100C:0F y 75C:25F,  $P < 0.05$ ). En general el EEM fue mayor en dietas altas en forraje (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Proporción de AGV's en líquido ruminal y excretas con levadura como inóculos, en cinco dietas contrastantes de C y F, a las 24 horas.

AGV's	Dieta	Líquido ruminal	Excretas con levadura	Valor P	EEM
Acético	100C:0F	67.5 <sup>b</sup>	76.3 <sup>a</sup>	0.029	1.726
	75C:25F	68.7 <sup>b</sup>	77.1 <sup>a</sup>	0.038	1.205
	50C:50F	71.3	76.9	0.133	1.610
	25C:75F	73.7	78.2	0.192	1.647
	0C:100F	72.0	77.5	0.239	2.376
Propiónico	100C:0F	24.7 <sup>a</sup>	15.5 <sup>b</sup>	0.014	1.378
	75C:25F	24.2 <sup>a</sup>	16.2 <sup>b</sup>	0.030	0.997
	50C:50F	22.4	16.6	0.143	1.758
	25C:75F	20.7	15.5	0.229	2.156
	0C:100F	20.6	17.6	0.213	1.196
Butírico	100C:0F	7.8	8.2	0.555	0.488
	75C:25F	7.1	6.7	0.798	1.206
	50C:50F	6.3	6.5	0.841	0.788
	25C:75F	5.6	6.3	0.492	0.589
	0C:100F	7.4	4.9	0.407	1.720

C: Concentrado, F: Forraje, EEM: Error estándar medio. Superíndices distintos en filas, indican diferencias estadísticas entre inóculos ( $P < 0.05$ ).

Las proporciones de ácido graso butírico (Cuadro 13) se observaron proporciones similares ( $P > 0.05$ ) para cada inóculo (líquido ruminal y excretas con levadura) para cada tipo de dieta (100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F, 0C:100F).

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Producción de gas *in vitro*

En el presente estudio se logró establecer, que las excretas de ovino adicionadas con levadura inactivada pueden ser utilizadas como inóculo alternativo en la incubación de alimentos para rumiantes en la técnica de producción de gas *in vitro* de Menke y Steingass (1988).

Con ambos inóculos evaluados, se registró una mayor producción de gas en las dietas con mayor proporción de concentrado (Figura 1), lo cual concuerda con las reportado por Arbabi *et al.* (2017). Por ese motivo, se puede presentar diferencia de producción de gas más notable en sustratos pobremente digestibles o altos en fibra (Ramin *et al.*, 2015).

Las excretas como inóculo tuvieron mejores resultados en sustratos concentrados, especulando que esto fue debido a una mayor presencia de carbohidratos solubles con baja concentración de componentes fibrosos (Wascheck *et al.*, 2010). En el caso específico de las excretas de ovinos, probablemente se tiene un ambiente favorable para bacterias anaeróbicas por su forma encapsulada, lo cual contribuiría a producir una mayor y consistente producción de gas durante incubaciones en comparación con heces de otras especies (Muñoz *et al.*, 2019).

De acuerdo a lo referido por Melesse *et al.* (2017), existe una alta correlación entre el contenido de energía y el valor de producción de gas en pastos tropicales. Cavalcante *et al.* (2015), reportaron interacciones entre el inóculo y el sustrato durante la técnica de PGIV, similar a lo encontrado en el presente trabajo.

El tipo de dieta brindado a los animales donadores de inóculo tienen un efecto modificando la población de microorganismos en el rumen, tracto digestivo, en las heces (Chiaravalli *et al.*, 2019) y por consecuencia en la producción de gas (Dhanao *et al.*, 2021).

En el presente estudio, para los diferentes tiempos de incubación (hasta 48 horas) en las dietas, la PGIV obtenida con líquido ruminal fue mayor, a la registrada con inóculo de excreta con levadura, lo anterior concuerda con lo encontrado por Ramin *et al.* (2015), quienes también determinaron que la producción de gas y metano resultó menor al utilizar inóculo fecal que con líquido ruminal proveniente de vacas lactantes; por su parte Váradyová *et al.* (2005) reportaron que al incubar grano de cebada, paja de trigo y heno de pradera en jeringas de vidrio de 100 ml y/o transductores de presión, utilizando excretas como inóculo, tuvieron menor producción de gas que al utilizar líquido ruminal, de ovejas Merino.

Esto sugiere que la actividad de bacterias celulíticas, hemicelulolíticas y amilolíticas es mayor en el líquido ruminal que en las excretas, teniendo esto un efecto significativo en el perfil de producción de gas (Rymer *et al.*, 2005; Can *et al.*, 2009; Tuffarelli *et al.*, 2010), ya que se presenta un ambiente más adecuado de población microbiana, pH, humedad y osmolaridad (Geron *et al.*, 2019).

Las bacterias que aparecen en las heces se encuentran en modo supervivencia a lo largo del colon, con baja actividad metabólica (Pandian *et al.*, 2015). Además, existen algunos otros factores que pueden generar variabilidad entre investigaciones al utilizar la técnica de PGIV como el procesamiento del sustrato, composición química del sustrato, preparación de solución buffer y dieta de adaptación de donadores de inóculos (Aiple *et al.*, 1988; Tuffarelli *et al.*, 2010; Cavalcante *et al.*, 2015).

En el presente estudio, al utilizar el inóculo de excretas con levadura, su fase Lag de producción de gas fue mayor en comparación a la del líquido ruminal, similar a lo reportado por Mauricio *et al.* (2001), estudiando los microorganismos de la excreta de bovinos y con una menor actividad de fermentación (Pandian *et al.*, 2015). Dhanoa *et al.* (2021) reportaron que, al incubar dietas con inóculo de excretas, se puede tener un periodo largo de Lag, antes de que inicie la producción de gas.

El uso de heces como inóculo para incubaciones *in vitro* tiende a producir mayor variabilidad en los resultados, comparados con lo registrado con líquido ruminal como inóculo (Geron *et al.*, 2019), similar a lo observado en la presente investigación.

## **5.2 Efecto de la levadura inactivada**

En el presente estudio, la levadura inactivada adicionada a las excretas no mostró un efecto suficiente para que se pudieran alcanzar niveles de producción de gas similares a los del líquido ruminal. Lo anterior puede deberse a que la levadura inactivada adicionada no logró tener efecto para incrementar la actividad de bacterias en las excretas, o de estabilización del pH, tal como lo reportan Bach *et al.* (2007). Otra posibilidad sería que la falta en el incremento del contenido del nitrógeno microbiano, como lo mencionaron Erasmus *et al.* (1992).

Los componentes de la levadura inactivada tales como células muertas, productos del metabolismo de la levadura, como proteínas, polisacáridos (principalmente  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos), lípidos, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos y antioxidantes (Alugongo *et al.*, 2017) no aumentaron la actividad de fermentación de los microorganismos reflejándose en la PGIV en el presente estudio.

Se han reportado beneficios del uso de levadura inactivada para mejorar la eficiencia de degradabilidad de sustrato, mayor colonización de las partículas del pienso y para acelerar el crecimiento de bacterias celulolíticas (Oliveira *et al.*, 2020). Budak y Yilmaz (2020) reportaron efectos positivos de metabolitos provenientes de la levadura inactivada en la digestibilidad de componentes de pared celular en forrajes de alta como media calidad y su fermentación al aumentar la cantidad de AGV's.

### **5.3 Ecuaciones de predicción**

A partir de valores obtenidos de PGIV utilizando el inóculo alternativo de excretas con levadura, fue posible establecer ecuaciones de regresión lineal simple (Zhao y Chen, 2004; Posada *et al.*, 2012), regresión polinómica (Geron *et al.*, 2019) y factores de corrección, que permitieron estimar los valores de PGIV registrados al utilizar líquido ruminal como inóculo.

Las ecuaciones de regresión lineal simple (RLS) y polinómica (RPOL) de segundo grado, así como para el factor de corrección (FC) obtenidos en el presente estudio, permitieron estimar la PGIV obtenida con líquido ruminal a las 24 h, a partir de la PGIV obtenida al incubar los alimentos con excretas con levadura a las 24 h. Se logró tener una mejor estimación ( $P < 0.05$ ), utilizando la ecuación RPOL ( $R^2 = 0.7216$ ) de segundo grado construida a partir de los valores de PGIV obtenidos con excretas más levadura.

En el presente estudio, la estimación de PGIV de líquido ruminal obtenida con el Factor de Corrección (FC) fue menos exacta, mientras que la calidad de la estimación obtenida con RLS ( $R^2 = 0.637$ ) resultó ser de calidad intermedia, comparada con los valores originales de PGIV obtenidos con líquido ruminal como valores de referencia. Can *et al.* (2009), establecieron regresiones de la producción de gas a las 24 h a partir de líquido ruminal y excretas de ovinos obteniendo coeficientes de determinación de 0.56, menores a los encontrados en la presente investigación.

### **5.4 Energía metabolizable y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica**

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican que a partir de la producción de gas obtenida con excretas adicionadas con levadura, como inóculo para incubar alimentos y utilizando la ecuación polinómica establecida, es posible determinar la EM y la DIVMO, en valores equivalentes a los estimados con líquido

ruminal como inóculo, concordando esto con lo reportado por Aiple *et al.* (1992), así como con lo reportado por El-Meadaway *et al.* (1998) y Aghajanzadeh-Golshani *et al.* (2020).

En contraste a ello, Borba *et al.* (2001) obtuvieron una mala predicción de la digestibilidad a partir de la producción de gas menor con excretas de ovinos que con líquido ruminal de animales fistulados y sacrificados. Parámetros relacionados a la tasa de utilización (degradabilidad de MS, PC y FDN) han sido reportados por Cavalcante *et al.* (2015) obteniendo valores menores al utilizar heces como inóculo. De igual manera, al evaluar la digestibilidad de la fibra neutra se han encontrado valores menores al usar excretas como inóculo (Ramin *et al.*, 2015).

## **5.5 Ácidos Grasos Volátiles**

Las concentraciones de acetato, propionato y butirato y de ácidos grasos volátiles totales, se ven moduladas por la relación de forraje y concentrado en la dieta (Zhang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). De forma que con dietas concentradas ricas en almidón se asocian a un perfil de AGV's más rico en propionato (Wang *et al.*, 2020).

Algo esencial para la investigación del metabolismo del rumen, es la cuantificación precisa de las concentraciones y proporciones individuales de AGV's al reflejar diferentes vías metabólicas (Wang *et al.*, 2021). Los principales AGV's durante la fermentación ruminal son ácido acético y ácido butírico, como sustratos para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, y propionato como principal fuente de gluconeogénesis (Wang *et al.*, 2021).

La composición y dinámica de la comunidad microbiana del rumen mantiene una relación muy estrecha con los AGV's (Wang *et al.*, 2021). Se han reportado proporciones mayores de propionato al utilizar excretas como inóculo durante incubaciones de alimentos y proporciones similares de acetato en incubaciones con líquido ruminal y heces (Ramin *et al.*, 2015).



De acuerdo a Posada *et al.*, (2012) y Mohammadzadeh *et al.* (2014), las excretas tienen una cantidad de protozoarios menor que el líquido ruminal. Posiblemente esta sea una razón para las diferencias encontradas en las proporciones de AGV's acético y propiónico de presente estudio ya que estudios reportados por Machmüller *et al.* (2003) y Bird *et al.* (2008) indicaron que las proporciones de ácido butírico y acético fueron incrementadas mientras que las proporciones de ácido propiónico fueron disminuidas al aplicar una defaunación del líquido ruminal (Machmüller *et al.*, 2003; Hegarty *et al.*, 2008). En la literatura científica no se encontraron reportes de proporciones de AGV's acético, propiónico y butírico de incubaciones comparativas utilizando líquido ruminal o excretas como inóculo.

## 6 CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la posibilidad de utilizar excretas con levadura inactivada como inóculo para la técnica de producción de gas *in vitro*, con el fin de estimar la energía metabolizable y la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, de dietas con proporciones contrastantes de concentrado y forraje. De esta manera, es posible sustituir el líquido ruminal obtenido ya sea a partir de animales fistulados o con sonda orogástrica, contribuyendo esto a aumentar el bienestar animal y facilitar el incremento de animales donadores de inóculo. Se recomienda ampliar los trabajos realizados para corroborar los resultados en el presente estudio.

## 7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- AFRC (1995). Energy and Protein Requirements of Ruminants: An Advisory Manual. Agricultural and Food Research Council. Technical Committee on Responses to Nutrients. CABI Publishing, Wallingford. U.K.
- Aghajanzadeh-Golshani, A., Maheri Sis, N., SalamatDoust-Nobar, R., Ebrahimnezhad, Y., & Ghorbani, A. (2020). Estimating nutritional value of wheat and barley grains by *in vitro* gas production technique using rumen and faeces liquor of Gezel rams. *Journal of Animal Environment*, 12(2), 45-52. doi: 10.22034/aej.2020.105888.
- Aiple, K. P., Steingass, H., & Menke, K. H. (1992). Suitability of a buffered faecal suspension as the inoculum in the Hohenheim gas test. *Journal of Physiology and Animal Nutrition*, 67, 57–66.
- Al-Arif, M. A., Suwanti, L. T., Estoepangestie, A. S., & Lamid, M. (2017). The nutrients contents, dry matter digestibility, organic matter digestibility, total digestible nutrient, and NH<sub>3</sub> rumen production of three kinds of cattle feeding models. *Life Sciences*, 3(6), 338. <https://doi.org/10.185-02/kls.v3i6.1142>.
- Alba, H. D. R., Oliveira, R. L., Carvalho, S. T., Ítavo, L. C. V., Ribeiro, O. L., Do Nascimento, N. G., Freitas, M. D., & Bezerra, L. R. (2018). Can ruminal inoculum from slaughtered cattle replace inoculum from cannulated cattle for feed evaluation research?. *Ciencias Agrarias*, 39(5), 2133–2144. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p2133>.
- Alugongo, G. M., Xiao, J., Wu, Z., Li, S., Wang, Y., & Cao, Z. (2017). Review: Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0165-5>.
- Amanzougarene, Z., & Fondevila, M. (2020). Fitting of the *in vitro* gas production technique to the study of high concentrate diets. *Animals*, 10(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10101935>.
- Amanzougarene, Z., Yuste, S., & Fondevila, M. (2020). Fermentation pattern of several carbohydrate sources incubated in an *in vitro* semicontinuous system with inocula from ruminants given either forage or concentrate based diets. *Animals*. 10(2). <https://doi.org/10.3390/ani10020261>.
- AOAC (2005). Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Arbabi, S., Ghoorchi, T., & Ramzanpour, S. (2017). Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate the nutritive value of five forage to concentrate ratios. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(2), 249–257.
- ARC (1980). The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, England, U.K.
- Arce, C., Arbaiza, T., Carcelén, F., & Lucas, O. (2003). Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 14(1), 7–12.

- Aregheore, E. M. (2000). Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants *in vivo* and *in vitro* digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 85(1–2), 99–109. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00123-1).
- Aufrere, J., & Michalet-Doreau, B. (1988). Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 20(3), 203–218. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(88)90044-2).
- Bach, A., Iglesias, C., & Devant, M. (2007). Daily rumen pH pattern of loose housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology*, 136(1–2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2006.09.011>.
- Bachmann, M., Okon, P., Blunk, C., Kuhnitzsch, C., Martens, S.D., Steinhöfel, O., Zeyner, A. (2022). Ensiling and thermic treatment effects on nutrient content, protein solubility, and *in vitro* fermentation of partial crop faba beans. *Animal Feed Science and Technology*, 290 115349. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115349>.
- Bai, Y., Zhou, X., Li, N., Zhao, J., Ye, H., Zhang, S., Yang, H., Pi, Y., Tao, S., Han, D., Zhang, S., & Wang, J. (2021). *In vitro* fermentation characteristics and fiber-degrading enzyme kinetics of cellulose, arabinoxylan,  $\beta$ -glucan and glucomannan by pig fecal microbiota. *Microorganisms*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051071>.
- Barcelos, S. de S., Alves, K. S., Mezzomo, R., Luz, J. B., Cutrim, D. O., Gomes, D. Í., Oliveira, L. R. S., Nascimento, K. B., & Gionbelli, M. P. (2020). Energy and protein requirements of woolless sheep under tropical conditions. *Livestock Science*, 231103856. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103856>.
- Bharanidharan, R., Arokiyaraj, S., Kim, E. B., Lee, C. H., Woo, Y. W., Na, Y., Kim, D., & Kim, K. H. (2018). Ruminant methane emissions, metabolic, and microbial profile of Holstein steers fed forage and concentrate, separately or as a total mixed ration. *PLoS ONE*, 13(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202446>.
- Bird, S. H., Hegarty R. S. & Woodgate, R. (2008). Persistence of defaunation effects on digestion and methane production in ewes. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 152-155. doi: 10.1071/EA07298.
- Blümmel, M. & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science Technology*, 40, 109-119.
- Boever, J. L., Cottyn, B. G., Buysse, F. X., Wainman, F. W., & Vanacker, J. M. (1986). The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 14(3–4), 203–214. [https://doi.org/10.1016/03778401\(86\)90093-3](https://doi.org/10.1016/03778401(86)90093-3).
- Borba, A. E. S., Correia, P. J. A., Fernandes, J. M. M., & Borba, A. F. R. S. (2001). Comparison of three sources of inocula for predicting apparent digestibility of ruminant feedstuffs. *Animal Research*, 50(4), 265–273. <https://doi.org/10.1051/animres:2001113>.

- Bruss, M. L. (2008). Lipids and Ketones. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Sixth Edition, 81–115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00004-0>.
- Budak, D., & Yilmaz, A. (2020). The effects of adding inactive yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) to rations prepared with different quality roughages on fattening performance, nutrient digestibility, some rumen parameters and carcass yield in lambs. *Livestock Studies*, 60(2), 37–45. <https://doi.org/10.46897/livestockstudies.846383>.
- Can, A., Hummel, J., Mobashar, M., Boeser, U., & Südekum, K. H. (2009). Comparison of sheep ruminal fluid with sheep and horse faeces as inoculum for *in vitro* gas production measurements. *Journal of Applied Animal Research*, 35(2), 143–148. <https://doi.org/10.1080/09712119.2009.9707004>.
- Cannas, A., Nudda, A., & Pulina, G. (2002). Nutritional strategies to improve lactation persistency in dairy ewes. *Proceedings of the 8th great lakes*, 17–59.
- Cannas, A., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Pell, A. N., Van Soest, P. J., (2004). A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal Animal Science*, 82,149-169.
- Cannas, A., Tedeschi, L. O., Atzori, A. S., & Lunesu, M. F. (2019). How can nutrition models increase the production efficiency of sheep and goat operations?. *Animal Frontiers*, 9(2), 33–44.
- Cavalcante, S. E., Vasconcelos, V. R., Abdalla, A. L., Natel, A. S., Dhanasekaran, D., & Siqueira, J. C. (2015). *Tropentag 2015*, Berlin, Germany September,16–19.
- Cheeke, P. R. (2005). *Livestock feeds and feeding*. Upperb Saddle River, New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Chiaravalli, M., Rapetti, L., Graziosi, A. R., Galassi, G., Crovetto, G. M., & Colombini, S. (2019). Comparison of faecal versus rumen inocula for the estimation of NDF digestibility. *Animals*, 9, 928. <https://doi.org/10.3390/ani9110928>.
- Cholewińska, P., Górnjak, W., & Wojnarowski, K. (2021). Impact of selected environmental factors on microbiome of the digestive tract of ruminants. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02742-y>.
- Clark, J., & Beard, J. (1977). Prediction of the digestibility of ruminant feeds from their solubility in enzyme solutions. *Animal Feed Science and Technology*, 2(2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(77\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(77)90016-5).
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., & Bachmann, H. (2002). Influence of inoculum source on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1–4), 221–231. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00073-1).
- Cornou, C., Storm, I. M. L. D., Hindrichsen, I. K., Worgan, H., Bakewell, E., Ruiz, D. R. Y., Abecia, L., Tagliapietra, F., Cattani, M., Ritz, C., & Hansen, H. H. (2013). A ring test of a wireless *in vitro* gas production system. *Animal Production Science*, 53(6), 585–592. <https://doi.org/10.1071/AN12091>.

- Correddu, F., Fancello, F., Chessa, L., Atzori, A. S., Pulina, G., & Nudda, A. (2019). Effects of supplementation with exhausted myrtle berries on rumen function of dairy sheep. *Small Ruminant Research*, 170, 51–61.
- Crosby-Galván, M. & Ramírez-Mella, M. (2018). *In vitro* gas production technique used to estimate the production of methane. *Revista Agroproductividad*, 11(2), 64–69.
- CSIRO (2007). Nutrient requirements of domesticated ruminants. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia.
- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(3), 371–384.
- Dawson, K. A., Newman, K. E., Boling, J. A. (1990). Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science*, 68(10), 3392–3398. <https://doi.org/10.2527/1990.68103392x>.
- Deng, K. D., Jiang, C. G., Tu, Y., Zhang, N. F., Liu, J., Ma, T., Diao, Q. Y. (2014). Energy requirements of Dorper crossbred ewe lambs. *Journal of Animal Science*, 92, 2161–2169.
- Detmann, E., Gionbelli, M. P., Huhtanen, P. (2014). A meta-analytical evaluation of the regulation of voluntary intake in cattle fed tropical forage-based diets. *Journal of Animal Science*, 92(10), 4632–4641. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7717>.
- Dhanoa, M. S., López, S., Powell, C. D., Sanderson, R., Ellis, J. L., Murray, J. A. M. D., Garber, A., Williams, B. A., & France, J. (2021). An illustrative analysis of atypical gas production profiles obtained from *in vitro* digestibility studies using fecal inoculum. *Animals*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11041069>.
- Dryden, G. McL., (2008). *Animal nutrition science*. Cabi Series, CABI, Wallingford, UK. pp 22-25.
- El-Meadaway, A., Mir, Z., Mir, P. S., Zaman, M. S., & Yanke, L. J. (1998). Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining *in vitro* digestibility and gas production. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 673–679. <https://doi.org/10.4141/A97-109>.
- Engelking, L. R. (2015). Carbohydrate Structure. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 118–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50018-9>
- Erasmus, L. J., Botha, P. M., & Kistner, A. (1992). Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75(11), 3056–3065. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78069-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78069-2).
- FAO (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT.
- Fonsêca, V. F. C., Saraiva, E. P., Maia, A. S. C., Melo-Costa, C. C., dos Santos, S. G. C. G., Morais, L. K. C., Fuller, A., & Chiquitelli Neto, M. (2019). Training sheep for indirect calorimetry trials. *Small Ruminant Research*, 177, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2019.06.010>.
- Fuller, M. F. (2004). *The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing Series. pp 606. <https://doi.org/10.1079/9780851993690.0000>.

- Gallegos, P., & Bañuelos, R. (2019). Evaluación diferencial de extractos de orégano en la producción de ácidos grasos volátiles y metano durante fermentación ruminal *in vitro*. *Abanico Veterinario*, 9(1), 1–18.
- Geron, L. J. V., Veloso, L. E. C., De Aguiar, S. C., De Souza, A. L., De Souza Santos, I., Trautmann-Machado, R. J., De Moura Zanine, A., Da Silva, R. F., De Jesus Ferreira, D., & Zanin, S. F. P. (2019). *In vitro* fermentation of the rations containing *Morinda citrifolia* L. (Noni) using two types of inoculum. *Ciencias Agrarias*, 40(2), 831–842. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p831>.
- Getachew, G., Crovetto, G. M., Fondevila, M., Krishnamoorthy, U., Singh, B., Spanghero, M., Steingass, H., Robinson, P. H., & Kailas, M. M. (2002). Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 102(1–4), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00212-2).
- Hamid, P., Akbar, T., Hossein, J., & Ali, M. G. (2007). Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the *in vivo* and *in vitro* gas production techniques. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2(4), 108–113. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2007.108.113>.
- Hatew, B., Cone, J. W., Pellikaan, W. F., Podesta, S. C., Bannink, A., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2015). Relationship between *in vitro* and *in vivo* methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 20–31. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDS-CI.2015.01.012>.
- He, Y., Wang, H., Yu, Z., Niu, W., Qiu, Q., Su, H., & Cao, B. (2018). Effects of the gender differences in cattle rumen fermentation on anaerobic fermentation of wheat straw. *Journal of Cleaner Production*, 205, 845–853. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.09.156>.
- Hegarty, R. S., Bird, S. H., Vanselow, B. A. & Woodgate, R. (2008). Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. *British Journal of Nutrition* 100, 1220-7. doi: 10.1017/S0007114508981435.
- Hristov, A. N., Bannink, A., Crompton, L. A., Huhtanen, P., Kreuzer, M., McGee, M., Nozière, P., Reynolds, C. K., Bayat, A. R., Yáñez-Ruiz, D. R., Dijkstra, J., Kebreab, E., Schwarm, A., Shingfield, K. J., & Yu, Z. (2019). Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5811–5852. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-158>.
- Huertas-Molina, O. F., Londoño-Vásquez, D., y Olivera-Angel, M. (2020). Hiperce-tonemia: bioquímica de la producción de ácidos grasos volátiles y su metabolismo hepático. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1304>
- Hughes, M., Mlambo, V., Lallo, C. H. O., & Jennings, P. G. A. (2012). Potency of microbial inocula from bovine faeces and rumen fluid for *in vitro* digestion

- of different tropical forage substrates. *Grass and Forage Science*, 67(2), 263–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00841.x>
- Hungate, R. E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. 1<sup>st</sup> ed., Vol 4. Academic Press,. 533-1966 pp.
- Hynd, P.I. (2019). *Animal Nutrition: From Theory to Practice*. CSIRO Publishing. 416 pp.
- INRA (1988). *Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos*. Institut National de la Recherche Agronomique. Mundi-Prensa, Madrid (1990).
- Jeferson, L. M., Kieran, T. J., Seidel, D. S., Glenn, T. C., Magali, F., Callaway, T. R., & Stewart, R. L. (2020). Comparison of the ruminal and fecal microbiotas in beef calves supplemented or not with concentrate. *PLoS ONE*, 15(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231533>.
- Jenkins, T. C. (2011). Feed Supplements: Fats and Protected Fats. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition*, 1, 510–517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.10048-0>.
- Jing, X. P., Zhou, J. W., Wang, W. J., Degen, A. A., Guo, Y. M., Kang, J. P., Xu, W. X., Liu, P. P., Yang, C., Shi, F. Y., Yan, Q., Ding, L. M., Shang, Z. H., Fievez, V., & Long, R. J. (2019). Tibetan sheep are better able to cope with low energy intake than Small-tailed Han sheep due to lower maintenance energy requirements and higher nutrient digestibilities. *Animal Feed Science and Technology*, 254, 114200. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2019.06.004>
- Kato, D., Suzuki, Y., Haga, S., So, K., Yamauchi, E., Nakano, M., Ishizaki, H., Choi, K., Kato, K., Roh, S.G. (2016). Utilization of digital differential display to identify differentially expressed genes related to rumen development. *Journal of Animal Science*, 87, 584–590.
- Kellems, R. & Church, D. (2010). *Livestock feeds and feeding*. 6<sup>st</sup> ed., Vol. 1. Prentice Hall. pp 2-77.
- Kristensen, N. B., Huntington, G. B., & Harmon, D. L. (2005). Splanchnic carbohydrate and energy metabolism in growing ruminants. *Biology of Growing Animals*, 3(C), 405–432. [https://doi.org/10.1016/S1877-1823\(09\)70024-4](https://doi.org/10.1016/S1877-1823(09)70024-4)
- Krizsan, S. J., Nyholm, L., Nousiainen, J., Südekum, K. H., & Huhtanen, P. (2012). Comparison of *in vitro* and *in situ* methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. *Journal of Animal Science*, 90(9), 3162–3173. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4347>.
- Lawrence, J. M., Lawrence, A. L., & Watts, S. A. (2013). Feeding, digestion and digestibility of sea urchins. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 38, 135–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00009-5>.
- Li, S., He, L., Mo, F., & Zhang, W. (2023). *In situ* degradation kinetics of 25 feedstuffs and the selection of time points in mathematical statistics. *Animals*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/ani13050947>.
- Liu, Q., Wang, C., Yang, W. Z., Dong, Q., Dong, K. H., Huang, Y. X., Yang, X. M., & He, D. C. (2009). Effects of malic acid on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Animal*, 3(1), 32–39. <https://doi.org/10.1017/S1751731108003364>.



- López, S. (2009). *In vitro* and in situ techniques for estimating digestibility. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, 87–121. <https://doi.org/10.1079/9780851998145.0087>.
- Luo, T., Li, Y., Zhang, W., & Liu, J. (2022). Rumen and fecal microbiota profiles associated with immunity of young and adult goats. *Frontiers in Immunology*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.978402>.
- Machmüller, A., Soliva, C. R. & Kreuzer, M. (2003). Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction, Nutrition, Development* 43, 41-55. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900432/document>.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. (2015). *Biología de los microorganismos*. 4<sup>ta</sup> ed. Vol. 1. Pearson Educación S. A. pp 738-739.
- Mamun, M. A. A., Sandeman, M., Rayment, P., Brook-Carter, P., Scholes, E., Kasinadhuni, N., Piedrafita, D., & Greenhill, A. R. (2020). The composition and stability of the faecal microbiota of Merino sheep. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 280–291. <https://doi.org/10.1111/jam.14468>.
- Manteca, X. (2012). Capítulo VIII: Bienestar animal. *Red Porcina Iberoamericana*, pp 97–111.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S., & Theodorou, M. K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79(4), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4).
- Mauricio, R. M., Owen, E., Mould, F. L., Givens, I., Theodorou, M. K., France, J., Davies, D. R., & Dhanoa, M. S. (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*, 89(1–2), 33–48. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00234-0).
- McBee, R. H. (1953). Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied Microbiology*, 1, 106-110.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. and Wilkinson, R. G. (2010). *Animal Nutrition*. 7<sup>th</sup> ed. Vol 1. Prentice Hall Pearson. pp 341-477.
- McDonald, S. D., Pesarchuk, E., Don-Wauchope, A., El Zimaity, H., & Holloway, A. C. (2011). Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight. *Nutrition Research*, 31(9), 707–714. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2011.08.009>.
- Melesse, A., Steingass, H., Schollenberger, M., & Rodehutschord, M. (2017). Screening of common tropical grass and legume forages in Ethiopia for their nutrient composition and methane production profile *in vitro*. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 5(3), 163–175. [https://doi.org/10.1711-38/TGFT\(5\)163-175](https://doi.org/10.1711-38/TGFT(5)163-175).
- Mendes, M. S., Souza, J. G., Herbster, C. J. L., Brito Neto, A. S., Silva, L. P., Rodrigues, J. P. P., Marcondes, M. I., Oliveira, R. L., Bezerra, L. R., & Pereira, E. S. (2021). Maintenance and growth requirements in male

- Dorper × Santa Ines lambs. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.676956>.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). 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*. *Journal of Agricultural Sciences Cambridge*, 93, 217–222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>.
- Menke, K. H. & H. Steingass. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7-55.
- Meraz-Romero, E., Loera-Corral, O., Mendoza-Martínez, G. D., Meneses-Mayo, M., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., Angeles-Campos, S. C., Melgarejo-Velasquez, L. G., & Pinos-Rodríguez, J. M. (2012). Effect of pH and clarified ruminal fluid on the stability of an exogenous fibrolitic enzyme product. *Agrociencia*, 46(4), 347-358.
- Minozzi, G., Biscarini, F., Costa, E. D., Chincarini, M., Ferri, N., Palestrini, C., Minero, M., Mazzola, S., Piccinini, R., Vignola, G., & Cannas, S. (2021). Analysis of hindgut microbiome of sheep and effect of different husbandry conditions. *Animals* 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani11010004>.
- Mohamed, R., & Chaudhry, A. S. (2021). Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews*, 21(1), 68–81. <https://doi.org/10.1017/S0954422408960674>.
- Mohammadzadeh, H., Yáñez-Ruiz, D. R., Martínez-Fernandez, G., & Abecia, L. (2014). Molecular comparative assessment of the microbial ecosystem in rumen and faeces of goats fed alfalfa hay alone or combined with oats. *Anaerobe*, 29, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.012>.
- Mould, F. L., Morgan, R., Kliem, K. E., & Krystallidou, E. (2005). A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 155–172. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002>.
- Mu, Y., Lin, X., Wang, Z., Hou, Q., Wang, Y., & Hu, Z. (2019). High-production dairy cattle exhibit different rumen and fecal bacterial community and rumen metabolite profile than low-production cattle. *Microbiology Open*, 8(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mbo3.673>.
- Muetzel, S., Hunt, C., & Tavendale, M. H. (2014). A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.05.016>.
- Muñoz-Espinoza, M., Barros-Rodríguez, M., Valencia-Nuñez, R., Mera-Andrade, R., Artieda-Rojas, J., Najarro, R., Freire-Torres, M., Vega-Falcon, V., & Romero-Fernandez, A. (2019). Biogas production and *in vitro* CH<sub>4</sub> from excrement of cattle, sheep, pigs and hen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 833–836.
- Nakamura, S., Haga, S., & Kimura, K. (2018). Propionate and butyrate induce gene expression of monocarboxylate transporter 4 and cluster of differentiation 147 in cultures rumen epithelial cells derived from

- preweaning dairy calves. *Journal of Animal Science*, 96(11), 4902–4911. <https://doi.org/doi: 10.1093 / jas / sky334>.
- Navarro-Ortiz, C. A. & Roa-Vega, M. L. (2018). Comparación de la digestibilidad de tres especies forrajeras estimada mediante diferentes técnicas. *Orinoquia*, 22(1), 15–33.
- Nocek, J. E. (1988). *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2051–2069. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(88\)79781-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(88)79781-7).
- NRC (2007). Nutrient requirements of small ruminants. Committee on the Nutrient Requirements of Small Ruminants; Board on Agriculture and Natural Resources; Division on Earth and Life Studies; National Research Council. National Academy Press. Washington D.C., USA.
- Ochoa, L. (1999). Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Nom-062-Zoo, 1–58.
- Offner, A., Bach, A., & Sauvant, D. (2003). Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1–4), 81–93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5)
- Olaisen, V., Mejdell, T., Volden, H., & Nesse, N. (2003). Simplified *in situ* method for estimating ruminal dry matter and protein degradability of concentrates. *Journal of Animal Science*, 81(2), 520–528. <https://doi.org/10.2527/2003.812520x>.
- Oliveira, A. P., Pereira, E. S., Biffani, S., Medeiros, A. N., Silva, A. M. A., Oliveira, R. L., & Marcondes, M. I. (2018). Meta-analysis of the energy and protein requirements of hair sheep raised in the tropical region of Brazil. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/jpn.12700>.
- Oliveira, Alessandra Pinto, Cunha, C. S., Pereira, E. S., Biffani, S., de Medeiros, A. N., de Azevedo Silva, A. M., & Marcondes, M. I. (2020). Meta-analysis of dry matter intake and neutral detergent fiber intake of hair sheep raised in tropical areas. *PLoS ONE*, 15, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244201>.
- Opsi, F., Fortina, R., Tassone, S., Bodas, R., & López, S. (2012). Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage:concentrate ratio. *Journal of Agricultural Science*, 150(2), 271–283. <https://doi.org/10.1017/S0021859611000578>.
- Owens, F. N., & Basalan, M. (2016). Rumenology. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2>
- Pandian, C. S., Reddy, T. J., Sivaiah, K., Blummel, M., & Reddy, Y. R. (2016). Faecal matter as inoculum for *in vitro* gas production technique. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16(2), 271–281. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2016.00023.8>.
- Patil, P. V., & Patil, M. K. (2022). Factors affecting nutrient digestibility in animals. *Just Agriculture*, 2(7), 1–6.
- Pino, F., Mitchell, L. K., Jones, C. M., & Heinrichs, A. J. (2018). Comparison of diet digestibility, rumen fermentation, rumen rate of passage, and feed

- efficiency in dairy heifers fed ad-libitum versus precision diets with low and high quality forages. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1296–1306. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1498788>.
- Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(4), 64–69.
- Posada, S. L., Noguera, R. R., & Segura, J. A. (2012). Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4), 592–602.
- Ramin, M., Lerose, D., Tagliapietra, F., & Huhtanen, P. (2015). Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated *in vitro* gas production system. *Livestock Science*, 181, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.025>.
- Ramírez Lozano, R. G. (2007). Los pastos en la nutrición de los rumiantes. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rankins, D. L., Ruffin, D. C., & Pugh, D. G. (2002). Feeding and Nutrition. *Sheep & Goat Medicine*, 19–60. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169052-1/50004-1>.
- Reyna-Gómez, L. M., Cruz-López, A., Alfaro, J. M., & Suárez-Vázquez, S. I. (2021). Evaluation of the production of biohydrogen during the co-digestion of organic wastes in an upflow hybrid anaerobic reactor. *Chemical Engineering Journal*, 425. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129235>
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 9–30. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2005.04.055>.
- Salah, N., Sauvant, D., & Archimède, H. (2014). Nutritional requirements of sheep, goats and cattle in warm climates: a meta-analysis. *Animal*, 8(9), 1439–1447. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001153>.
- Sauvant, D., Perez, J.-M., Tran, G. (2002). Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage : porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. Institut national de la recherche agronomique (France), & Association française de zootechnie, Segunda edición, pag 43-52, ISBN 2-7380-1158-6.
- Schwartzkopf, K. S., Beauchemin, K. A., Gibb, D. J., Crews, D. H., Streeter, M., Mcallister, T. A., & Hickman, D. D. (2003). Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *Journal of Animal Science*, 81, 149–158.
- Serranito, B., Cavalazzi, M., Vidal, P., Taurisson-Mouret, D., Ciani, E., Bal, M., Rouvellac, E., Servin, B., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Hall, S. J. G., Lenstra, J. A., Pompanon, F., Benjelloun, B., & Da Silva, A. (2021). Local adaptations of Mediterranean sheep and goats through an integrative approach. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00682-z>.
- SIAP (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción ganadera, Sección resumen concentrado de la producción.

- Simões, J., Abecia, J. A., Cannas, A., Delgadillo, J. A., Lacasta, D., Voigt, K., & Chemineau, P. (2021). Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal*, 15, 100293. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2021.100293>.
- Storm, I. M. L. D., Louise, A., Hellwing, F., Nielsen, N. I., & Madsen, J. (2012). Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*, 2, 160–183. <https://doi.org/10.3390/ani2020160>.
- Suassuna, J. M. A., Andrade, A. P. D., Menezes, D. R., Teles, Y. C. F., Araujo, C. M., Lima, L. K. S., Beelen, P. M. G., Magalhães, A. L. R., Fernandes, B. D. O., & Medeiros, A. N. (2023). Accuracy of techniques for predicting gas production by ruminants associated with diet. *Fermentation*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010039>.
- Tagliapietra, F., Cattani, M., Hindrichsen, I. K., Hansen, H. H., Colombini, S., Bailoni, L., & Schiavon, S. (2012). True dry matter digestibility of feeds evaluated *in situ* with different bags and *in vitro* using rumen fluid collected from intact donor cows. *Animal Production Science*, 52(5), 338–346. <https://doi.org/10.1071/AN11206>.
- Tassone, S., Fortina, R., & Peiretti, P. G. (2020). *In vitro* techniques using the DaisyII incubator for the assessment of digestibility: A review. *Animals*, 10(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ani10050775>.
- Tedeschi, L. O., & Fox, D. G. (2018). The ruminant nutrition system: an applied model for predicting nutrient requirements and feed utilization in ruminants. *The journal of Agricultural Science*, 155(7), 1188–1189. doi:10.1017/S0021859617000296
- Tedeschi, L. O., Cannas, A. & Fox, D. G. (2010). A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and nutrients for domesticated small ruminants: the development and evaluation of the Small Ruminant Nutrition System. *Small Ruminants*. 89(2–3), 174–184. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.041.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).
- Tilley, J. M. & Terry, R. A. (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18, 104-111. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>.
- Tufarelli, V., Cazzato, E., Ficco, A., & Laudadio, V. (2010). Evaluation of chemical composition and *in vitro* digestibility of appennine pasture plants using yak (*Bos grunniens*) rumen fluid or faecal extract as inoculum source. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(12), 1587–1593. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.10151>.
- Váradyová, Z., Baran, M., & Zeleňák, I. (2005). Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 Part 1, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.030>

- Van Gastelen, S., Schumacher, F., Cone, J. W., Dijkstra, J., & Pellikaan, W. F. (2019). In dairy cattle, the stomach tube method is not a feasible alternative to the rumen cannulation method to examine *in vitro* gas and methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 256, 114259. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2019.114259>.
- Van Gelder, A. H., Hetta, M., Rodrigues, M. A. M., De Boever, J. L., Den Hartigh, H., Rymer, C., Van Oostrum, M., Van Kaathoven, R., & Cone, J. W. (2005). Ranking of *in vitro* fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 243–253. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2005.04.044>.
- 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. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(91)78551-2).
- Van Soest, P.J. (1994) *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd Edition, Cornell University Press, Ithaca, 476.
- Vera-Bravo, D. N., Mejia-Chanaluisa, K. F., Pastran-Calles, F. R., & Mendoza-Mejía, J. L. (2021). Determinación de la digestibilidad *in vitro* en heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) adicionando enzimas exógenas xilanasas. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8, 77–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.53287/dbiv4116ea97z>.
- Villalobos, C., Gonzales, E., & Ortega Santos, J. A. (2000). Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. *Técnica Pecuaria en México*, 38(2), 119–134.
- Wang, M., Wang, H., Zheng, H., Uhrin, D., Dewhurst, R. J., & Roehe, R. (2021). Comparison of HPLC and NMR for quantification of the main volatile fatty acids in rumen digesta. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03553-9>.
- Wascheck, R. C., Rezende, P. L. P., Moreira, P. C., Reis, R. B., Rosa, S. R. A., & Mendonça, A. C. (2010). Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de fontes energéticas alternativas na alimentação de ruminantes. *Animal Sciences*, 32(4), 425-430. doi: 10.4025/actascianimsci.v32i4.8835.
- Wilkins, J. R. (1974). Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Applied Microbiology*, 27(1), 135-40.
- Wongkittichote, P., Ah-Mew, N., & Chapman, K. A. (2017). Propionyl-CoA carboxylase – A review. *Molecular Genetics and Metabolism*. 122(4), 145–152.