

Cinética de degradación ruminal *in vitro* de dietas con manzarina y rastrojo de maíz en ovinos

Kinetics of ruminal *in vitro* degradation of fermented apple pomace and corn stover diet in sheep

Alberto Muro Reyes*^o, Claudio Arzola Álvarez**, Carlos Rodríguez Muela**, Agustín Corral Luna**, Héctor Gutiérrez-Bañuelos*, Esperanza Herrera Torres***, Francisco Javier Gutiérrez Piña*, Alejandro Espinoza Canales*

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la degradabilidad de la manzarina como concentrado proteico mediante degradación ruminal *in vitro* por producción de gas de cuatro dietas a base de rastrojo de maíz como forraje y mezclas de diferentes proporciones de manzarina y harinolina en el concentrado. Los parámetros de cinética de degradabilidad mostraron una tendencia lineal para A ($p < 0.05$). Se concluyó que la manzarina cuando se utiliza con rastrojo de maíz en sustitución de harinolina, los patrones de fermentación en términos de producción de gas de la dieta se afectan de forma negativa retrasando el tiempo medio de producción de gas y la tasa de producción afectando la degradabilidad ruminal de las raciones para ovinos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the degradability of fermented apple pomace as protein concentrate in the rumen by measuring *in vitro* gas production of four diets based on corn stubble as fodder and mixtures of different proportions of fermented apple pomace and cottonseed meal in the concentrate. The degradability kinetics parameters showed a linear trend for A ($p < 0.05$). We conclude that fermented apple pomace, when combined with corn stubble in substitution of cottonseed meal, has a negative effect on fermentation patterns in terms of gas production from the diet, delaying the average time for gas production, and the production rate affects the ruminal degradability of feed in sheep.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz se distribuye ampliamente en México con fines de producción de grano, ya sea para consumo humano o animal. En la alimentación animal es importante por su alto valor energético, usando el grano, la planta completa ensilada o los esquilmos de la cosecha del grano. De su biomasa aérea total el 50% corresponde al grano y el resto a diversas estructuras de la planta tales como caña, hojas, espiga, entre otras; a este conjunto se le denomina esquilmo o rastrojo de maíz. Al igual que el rastrojo de maíz en algunas regiones, la manzana de desecho o el bagazo de manzana representa un subproducto agrícola o industrial de alto valor nutritivo e incluso este valor puede incrementarse si se somete a un proceso de fermentación sólida, lo cual nos da como resultado un producto con concentración superior de Proteína Cruda (PC), que tiene su origen principalmente microbiano y por lo tanto de alta calidad, a este subproducto final se le conoce como manzarina (Becerra Bernal *et al.*, 2008; Rodríguez-Muela *et al.*, 2015).

La digestibilidad de los forrajes o las raciones completas para ganado pueden ser estimadas por métodos biológicos, algunos de los cuales pretenden simular el proceso de digestión, uno de los métodos más utilizados

Recibido: 31 de enero de 2016
Aceptado: 10 de marzo de 2017

Palabras clave:

Manzarina; rastrojo de maíz; cinética de degradabilidad; ovinos.

Keywords:

Fermented apple pomace; corn stover; degradability kinetics; sheep.

Cómo citar:

Muro Reyes, A., Arzola Álvarez, C., Rodríguez Muela, C., Corral Luna, A., Gutiérrez-Bañuelos, H., Herrera Torres, E., Gutiérrez Piña, F. J., & Espinoza Canales, A. (2017). Cinética de degradación ruminal *in vitro* de dietas con manzarina y rastrojo de maíz en ovinos. *Acta Universitaria*, 27(2), 17-23. doi: 10.15174/au.2017.1200

* Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zac., México. Correos electrónicos: amurey@hotmail.com; gtzbahector@hotmail.com; fj_gp@yahoo.com.mx; alexespinoza82@live.com.mx

** Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., México. Correos electrónicos: carzola@uach.mx; crmuela@uach.mx; dr.corral.luna@gmail.com

*** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. Correo electrónico: hetoets99@yahoo.com.mx

^o Autor de correspondencia.

es el de producción de gas *in vitro* (Menke *et al.*, 1979). La técnica de producción de gas *in vitro* permite obtener la cinética de degradabilidad de los alimentos para el ganado cuando estos son incubados dentro de frascos; el principio de la técnica es que el gas producido es el resultado de la fermentación ruminal, este gas contenido en los frascos es leído por un aparato de presión digital estandarizado, mediante la técnica podemos inferir que el volumen de producción de gas corresponde a cierta cantidad de degradabilidad de la materia seca y con este principio deducir la similitud o diferencias de degradabilidad de los diferentes substratos (Mizubuti *et al.*, 2014; Zerbini, Krishan, Victor, & Sharma, 2002).

A menudo el rastrojo de maíz se utiliza como dieta basal en raciones para mantenimiento de ovinos suplementándose con productos como la harinolina, pero esta es de los ingredientes más costosos, es por eso que se buscan ingredientes que sean fáciles de producir y con valores nutrimentales similares o mejores, tal es el caso de la manzarina. El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante la cinética de degradación ruminal *in vitro* la substitución de la harinolina por manzarina como suplemento proteico con rastrojo de maíz en ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Producción de Ovinos y el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua, situada sobre el Periférico Francisco R. Alameda km 1, a una altitud de 1435 msnm, temperatura

media anual de 18.2 °C, precipitación media anual de 387.5 mm³. Localización geográfica 28° 38' latitud Norte y 106° 04' longitud Oeste (Álvarez, 1990).

Preparación de manzarina

La manzana de desecho molida fue adicionada con 1.5% de urea, 0.20% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento vitamínico y mineral. Una vez mezclada se sometió a fermentación en piso de concreto bajo condiciones aeróbicas y de temperatura ambiente en un invernadero, con volteado cada 2 h durante 1 día para oxigenarlas y estimular la respiración de los microorganismos aerobios. Posteriormente, cuando las muestras se fermentaron durante el proceso de FES (fermentación en estado sólido) y perdieron la humedad suficiente para su almacenamiento, fueron molidas en un molino Wiley MR con malla de 1 mm para el posterior análisis químico en laboratorio.

Muestras analizadas

Las dietas se formularon para ser isoproteicas e isoenergéticas con base en la composición química de los ingredientes reportada en la literatura. El rastrojo de maíz se utilizó en conjunto con la fuente proteica manzarina, comparada con la harinolina. Se manejó como tratamientos 4 dietas formuladas cuyo aporte de proteína correspondió principalmente a la manzarina: harinolina aportando un 0:100% (dieta 1), 33:66% (dieta 2), 66:33% (dieta 3) y 100:00% (dieta 4) de los requerimientos de PC (9.6%) y el resto (100%, 66%, 33% y 0%) proveniente de harinolina. En la tabla 1 se muestra la composición de la dieta. Los animales tuvieron libre acceso al consumo de agua.

Tabla 1.
Composición de las dietas en base seca.

Ingrediente	Dieta 1 ¹ 0%:100%	Dieta 2 33%:66%	Dieta 3 66%:33%	Dieta 4 100%:0%
Rastrojo de maíz	23.4	21.1	18.7	17.5
Maíz molido	55.1	54.1	53.1	50.6
Harinolina	11.5	7.9	4.1	0.0
Melaza	7.7	7.9	8.1	8.2
Mezcla mineral	0.8	0.8	0.8	0.8
Carbonato de calcio	0.3	0.3	0.3	0.3
Fosfato dicálcico	0.6	0.6	0.6	0.6
Sal	0.8	0.8	0.8	0.8
Manzarina	0.0	6.5	13.4	21.0

¹ % manzarina: % harinolina
Fuente: Elaboración propia.

Animales

Se usaron cuatro ovinos machos de 60 (\pm 2.5) kg en promedio como donadores de inóculo los cuales fueron equipados con una cánula ruminal permanente y alojados en corraletas individuales. La dieta que consumieron los animales fue a base de manzarina como ingrediente proteico y harinolina en las mismas proporciones evaluadas *in vitro*, además de minerales para cubrir los requerimientos nutricionales de mantenimiento (*National Research Council* [NRC], 2007). La alimentación se realizó a las 8:00 a.m. y 4:00 p.m. Se realizaron tres incubaciones en frascos por cada tratamiento e inóculo respectivamente.

Análisis químico

Se realizó el análisis químico a las dietas tal cual se ofrecieron a los animales. La materia seca y proteína cruda fueron determinadas de acuerdo al procedimiento descrito por A. O. A. C. (2005). Las determinaciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se realizaron por el método de Goering y Van Soest (1970).

Degradabilidad por producción de gas *in vitro*

El procedimiento de Producción de Gas (PG) *in vitro* se realizó de acuerdo a la técnica de Menke y Steingass (1988) con algunas modificaciones para incubaciones en frascos. Este método es utilizado para determinar la cantidad de gas producido mediante la incubación de alimentos para rumiantes en un periodo de incubación de 96 h. La cantidad de gas liberado está estrechamente relacionado con la degradabilidad del alimento. La preparación de la muestra involucró el molido usando un tamiz de 1 mm (Menke *et al.*, 1979) y secado a 105 °C por 8 h. El fluido ruminal se colectó 15 min antes de iniciar la prueba. La toma del fluido ruminal colectado de los ovinos fue realizada inmediatamente antes de la alimentación, considerando que los microorganismos son menos activos pero más consistentes en su composición y actividad (Blummel & Orskov, 1993). El medio ruminal *in vitro* estuvo formado por amortiguadores de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales y resazurina. Se utilizó CO₂ durante la preparación del medio para asegurar un ambiente anaerobio al tiempo de la inoculación. Las soluciones A, B, C y resazurina se agregaron dentro de un matraz con agua destilada, el cual se introdujo en un incubador rotatorio (Incubador Shaker I2400) a 39 °C, posteriormente se le agregó la solución reductora y se burbujeó CO₂ a toda la mezcla hasta que el color se tornó de azul a rosa y

finalmente claro (transparente). El fluido ruminal previamente colectado fue filtrado a través de muselina y mezclado junto con la saliva artificial, la relación final saliva artificial: fluido ruminal fue de 2:1.

La cantidad de muestra empleada y registrada dentro de los 12 frascos (tres frascos por tratamiento) fue de 200 mg de muestra, a cada frasco se le agregaron 30 ml de la solución saliva artificial y fluido (en una relación 2:1, respectivamente). A partir de ese momento se registró el volumen inicial y se introdujeron al incubador con agitación continua donde permanecieron durante 96 h. Las lecturas de producción de gas se hicieron a las 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h mediante punción de los frascos en incubación registrando la presión con la ayuda de un transductor de la marca FESTO®. Los perfiles de producción de gas se ajustaron con el modelo logístico para una etapa o fase de Groot, Cone, Williams, Debersaques y Lantinga (1996), el cual es:

$$G = A / (1 + (B/t)^C)$$

donde: G, producción de gas (ml/200 mg MS) al tiempo de incubación *t*; A es la asíntota o producción de gas (ml / 200 mg MS) cuando $t \rightarrow \infty$; B, tiempo (h) de incubación al cual se alcanza la mitad de la producción de gas asíntótica; C, constante que determina la forma de la curva y, por lo tanto, la posición del punto de inflexión, dado por: $t_1 = B((C - 1)/(C + 1))^{1/C}$; y finalmente *t*, que es el tiempo de incubación en horas.

Diseño experimental y análisis de varianza

Se utilizó un diseño en cuadro latino 4 × 4, correspondiendo a las cuatro dietas probadas (niveles de manzarina en las dietas-tratamientos), a los cuatro ovinos usados (columnas) y los cuatro periodos (hileras) que se utilizaron en la prueba. En cada periodo se realizaron tres incubaciones en frascos por animal donador y dieta. Cada periodo constó de 13 días de adaptación a la respectiva dieta y 1 día para la Colecta del líquido ruminal. Las variables medidas fueron aquellas de la composición química de las dietas y la producción de gas a los distintos tiempos de incubación, en tanto que las variables de respuesta estimadas fueron los parámetros A, B y C del modelo de Groot *et al.* (1996).

Las variables de respuesta se analizaron con el siguiente modelo lineal mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + P_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} es la variable de respuesta; μ es la media general, común a todas las observaciones; α_i es el

efecto fijo de la i -ésima dieta ($i = 1, 2, 3, 4$); β_j es el efecto aleatorio del j -ésimo borrego ($j = 1, 2, 3, 4$); P_k es el efecto fijo del k -ésimo periodo ($k = 1, 2, 3, 4$); y ϵ_{ijk} es la variación residual o error experimental, supuesto $N, I, \mu = 0, \sigma = 1$, también común a todas las observaciones.

Los datos se analizaron usando el PROC MIXED de SAS versión 9.0 (SAS, 2011) que se ajusta un modelo con el efecto fijo de tratamiento y el animal del efecto aleatorio. Los errores se ajustaron a una varianza y covarianza de simétrica compuesta (CS), para el caso de la variable tiempo, y de la auto regresión de primer grado [AR (1)] para el caso del periodo variable, esto dentro de cada subpoblación definida por el periodo de muestreo. Cuando el efecto de tratamiento resultó significativo, se realizó un análisis de tendencia mediante contrastes polinomiales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de las dietas

En lo concerniente a la cantidad de FDA se observaron diferencias ($p < 0.05$) en las cuatro dietas coincidiendo con el aumento gradual de la manzanarina en las dietas, pero también el contenido de forraje (rastroy de maíz), el cual constituyó aproximadamente el 20%. Aun así, el análisis de estos nutrientes se realizó a las dietas completas, forraje y concentrado mezclados. El contenido de FDA fue de 13%, 15.17%, 16.7% y 20.1% para las dietas con 0, 33, 66 y 100 % de manzanarina, respectivamente, siendo diferentes entre ellas ($p < 0.05$). Análisis previos del valor nutritivo de la manzanarina muestran que esta contiene cantidades de FDA de 53.4% y FDN de 64.5% (Becerra Bernal *et al.*, 2008), por lo que la inclusión de la manzanarina impacta también en las concentraciones de fibra en las dietas. Las concentraciones de FDN presentaron un comportamiento similar al de las de FDA, incrementando de manera gradual conforme aumentó la concentración

de manzanarina en las dietas ($p < 0.05$). Los valores de FDN fueron de 27.6 % para la dieta 1 que presentó las cantidades más bajas, 29.7 % para la dieta 2, 31.4% la dieta 3 y la dieta 4 con las concentraciones más altas de 35.0 % ($p < 0.05$). Aunque las dietas fueron balanceadas de forma isoproteica e isoenergética en ocasiones los ingredientes con los que se preparan no siempre contienen las cantidades precisas de nutrientes que reporta la literatura por cuestiones varias. El contenido de PC para la dieta 1 fue de 8.36%, para la dieta 2% de 9.71% la cual como se podrá ver fue la que presentó la concentración superior, la dieta 3 con 8.44% y 8.22% para la dieta 4 con el porcentaje inferior ($p < 0.05$). Existen otros beneficios para incluir la manzanarina en la alimentación de animales además de poder utilizarla como sustituto de algún ingrediente proteico como la mejor de la actividad antioxidante en el plasma y la salud del epitelio ruminal en ovinos (Rodríguez-Muela *et al.*, 2015), y en cerdos se ha encontrado que el uso de pulpa de manzana beneficia la microflora intestinal y favorece la retención del nitrógeno (Cho *et al.*, 2012).

Degradabilidad *in vitro* por producción de gas

Los volúmenes de producción de gas obtenidos por la incubación *in vitro* durante 96 h de las cuatro dietas no mostraron diferencias a ninguna hora de evaluación ($p > 0.05$), estos se muestran en la tabla 2. Sin embargo, no se tiene conocimiento de la digestibilidad de este ingrediente y sus efectos sobre la degradabilidad de los demás ingredientes. Se requiere de investigación sobre la digestibilidad de este ingrediente solo y mezclado con otros para evaluar su impacto sobre la cinética de fermentación ruminal y así poder incorporarlo en las dietas de una manera precisa y estratégica a favor de la óptima producción del animal, pues como se ha mencionado los ingredientes tienen efectos asociativos favorables o desfavorables dependiendo de los componentes que acompañan la ración completa (Liu, Susenbeth, & Sudekum, 2002).

Tabla 2.
Producción de gas (ml/200 mg MS) por tiempo de incubación (h) de las dietas evaluadas.

Dietas ¹	Horas de Incubación						
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1 (0%:100%)	10.45	17.88	23.93	31.61	35.57	36.01	37.13
2 (33%:66%)	6.93	14.19	25.83	36.50	45.50	50.01	51.58
3 (66%:33%)	5.71	12.46	21.96	28.97	33.64	35.79	36.47
4 (100%:0%)	5.72	11.96	19.08	27.90	34.10	35.39	36.22
E.E.	1.06	2.05	2.95	3.70	4.43	4.74	5.0

¹ % manzanarina: % harinolina
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.

Cuadros mínimos para los parámetros de la degradabilidad ruminal de la materia seca, y contrastes polinomiales en las dietas de manzarina con rastrojo mediante un modelo monofásico.

Dietas/ Contraste	Parámetros		
	A	B	C
1	39.24	7.43	1.18
2	55.91	13.97	1.29
3	38.01	10.03	1.44
4	39.35	12.9	1.29
E.E.	5.86	1.7	0.08
Tendencias observadas:			
Lineal	*	**	
Cuadrática			*

1 = Manzarina 0%, 2 = Manzarina 33%, 3 = Manzarina 66%, 4 = Manzarina 100%. A = asíntota en la producción de gas. B = tiempo medio de producción de gas. C = una constante indicadora de la tasa de cambio de producción de gas. * Medias en la misma columna con diferente superíndice son diferentes ($p < 0.05$). ** = $p < 0.01$.

Fuente: Elaboración propia.

Aunque no se encontró diferencia significativa durante la mayoría del tiempo de incubación la dieta 2 ($p > 0.05$) fue la que presentó los volúmenes de gas superiores entre las dietas con manzarina acentuando estas diferencias sobre todo a la hora 96 de incubación. Lo anterior puede deberse a que existen asociaciones entre ingredientes que conforman una dieta sobre todo durante las primeras horas de incubación, dicha asociación puede mantener, afectar o favorecer la degradabilidad *in vitro* entre dietas con diferentes concentraciones de ingredientes (Getachew, Makkar, & Becker, 1998).

Se sabe que la fermentación se debe al conjunto de ingredientes presentes en la dieta y que en la mayoría de las veces los comportamientos entre dietas con cantidades de nutrientes similares, pero con diferentes ingredientes pueden cambiar los patrones de fermentación *in vitro*, esto se debe en gran parte a una asociación positiva de los ingredientes o balance positivo (Liu *et al.*, 2002). La degradación de los alimentos comienza con los nutrientes más fácilmente digeribles como es el caso de los carbohidratos solubles y proteínas digeribles en rumen, esta fermentación ocurre durante las primeras horas, principalmente cuando son dietas completas o concentrados los que se incuban, pues en estos casos los nutrientes son disueltos en el medio y no necesitan ser colonizados por los microorganismos (Groot *et al.*, 1996). Así, pues, la producción de gas dependerá de la composición química de los alimentos o dietas evaluadas (Garcianera & Villalba 2002).

Parámetros de la cinética de fermentación *in vitro*

En la tabla 3 se muestran los parámetros de cinética de fermentación y las asíntotas de cada fase obtenidas por el modelo monofásico. El parámetro A para las cuatro dietas no mostró diferencias ($p > 0.05$). Los valores obtenidos fueron de 39.24 ml de gas por cada 200 mg de MS para la dieta 1, 55.91 ml de gas para la dieta 2, 38.01 en la dieta 3 y en la dieta 4 se observaron 39.35 ml de gas, aunque numéricamente se observaron valores heterogéneos estos no fueron diferentes ($p > 0.05$), debido al EE. El parámetro B no mostró diferencias y los valores fueron 7.43, 13.97, 10.03 y 12.90 ml de gas para las dietas 1, 2, 3 y 4 ($p > 0.05$), dicho parámetro es el tiempo medio de formación de gas después de la incubación. El parámetro C tampoco mostró diferencias significativas ($p > 0.05$), los valores obtenidos fueron 1.18 ml de gas para la dieta 1, 1.29 para la dieta 2, 1.44 para la dieta 3 y 1.29 para la dieta 4. En referencia a los contrastes polinomiales para las tendencias lineal, cuadrática y cúbica, los efectos para tratamiento en el parámetro A fue significativo ($p < 0.05$) solo para la tendencia lineal. Para el parámetro B, el efecto de tratamiento fue significativo ($p < 0.01$) para la tendencia lineal. Dado que este parámetro tiende a aumentar significativamente con la adición de harinolina en la dieta, también se observó una menor eficiencia de la manzarina en comparación de la harinolina. El parámetro C registró una tendencia cúbica significativa ($p < 0.05$). El modelo que logre el mejor ajuste a los perfiles de producción de gas observados permite realizar la interpretación de los datos con una ecuación adecuada, y por consiguiente plasmar una comparación más correcta de los substratos estudiados y obtener estimadores con el menor sesgo de las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales (Groot *et al.*, 1996; Williams, 2000).

Son muchos los modelos disponibles para la parametrización de los perfiles de degradación ruminal, todos ellos con ventajas y desventajas de ajustes estadísticos, pero también dependientes de las condiciones experimentales y por supuesto del tipo de sustrato. En el presente trabajo se evaluaron varios modelos como fue el logístico propuesto por Schofield, Pitt y Pell (1994), el de Gompertz propuesto por Lavenčič, Stefanon y Susmel (1997), pero el modelo que logro mejor ajuste con los perfiles de gas observados en esta investigación fue el monofásico de Groot *et al.* (1996).

Aún y con la selección de un modelo con aceptable ajuste, los parámetros de fermentación de los substratos evaluados no mostraron diferencias ($p > 0.05$). Aunque los porcentajes de fibras y proteína contenidos en los substratos fueron significativos esto no se vio reflejado en la cinética de fermentación de los tratamientos pues como se ha mencionado un punto importante también es el incremento de la frecuencia de las lecturas de la producción de gas lo que ofrece perfiles más detallados (Williams, 2000). En el caso del presente trabajo las lecturas de los volúmenes de producción de gas se realizaron únicamente a la hora 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96, con una marcada disminución en la frecuencia sobre todo en las primeras 24 h de incubación las cuales son de suma importancia para determinar la cinética de degradación de los nutrientes más solubles en las dietas.

CONCLUSIONES

La manzanina puede ser usada en combinación con el rastrojo de maíz como concentrado proteico. El parámetro C mostro una tendencia cuadrática y fue afectado al igual que el parámetro B con el incremento de manzanina en sustitución de la harinolina en dietas basadas en rastrojo de maíz. Se requiere de más estudios sobre este subproducto usado como ingrediente proteico para determinar el efecto positivo de asociación de ingredientes sobre todo por ser la manzanina un producto no convencional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal de los Laboratorios de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología, ambos de la Universidad Autónoma de Chihuahua, las facilidades brindadas para realizar este experimento, tanto en la fase de campo como en la analítica.

REFERENCIAS

- Álvarez, G. A. (1990). *Boletín meteorológico del estado de Chihuahua*. In G. D. E. D., Chihuahua (ed.), SARH. Chihuahua: Dirección de Geografía y Meteorología.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg: Official Press. Methods.
- Becerra Bernal, A., Rodríguez Muela, C., Jiménez Castro, J., Ruiz Barrera, O., Iglesias, A. E., & Ramírez Godínez, J. A. (2008). Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína microbial. *Tecnociencia Chihuahua*, 2(1), 7-14.

- Blummel, M., & Orskov, E. R. (1993). Comparison of *in vitro* Gas-Production and Nylon Bag Degradability of Roughages in Predicting Feed-Intake in Cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2-3), 109-119. doi: 10.1016/0377-8401(93)90150-I
- Cho, S. B., Cho, J. H., Hwang, O. H., Yang, S. H., Park, K. H., Choi, D. Y., & Kim, I. H. (2012). Effects of Fermented Diets Including Grape and Apple Pomace on Amino Acid Digestibility, Nitrogen Balance and Volatile Fatty Acid (VFA) Emission in Finishing Pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(18), 3444-3451.
- Garciaarena, A. D., & Villalba, S. E. (2 al 4 de octubre, 2002). Producción de gas *in vitro*. E estimación de la degradabilidad de los alimentos para ruminantes. En *Congreso Argentino de Producción Animal*. Buenos Aires. AR.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). The *in vitro* gas coupled with ammonia measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 87-95.
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). *Forage Fiber Analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. University of Virginia: U.S. Agricultural Research Service.
- Groot, J. C. J., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. A., & Lantinga, E. A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64(1), 77-89. doi: 10.1016/S0377-8401(96)01012-7
- Lavrenčič, A., Stefanon, B., & Susmel, P. (1997). An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science*, 64(03), 423-431.
- Liu, J. X., Susenbeth, A., & Sudekum, K. H. (2002). *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *Journal of Animal Science*, 80(2), 517-524.
- Menke, K., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, 93(01), 217-222.
- Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28(1), 7-55.
- Mizubuti, I. Y., Ribeiro, E. L. D., Pereira, E. S., Peixoto, E. L. T., Moura, E. D., Do Prado, O. P. P., & Cruz, J. M. C. (2014). Ruminal degradation kinetics of protein foods by *in vitro* gas production technique. *Semina-Ciencias Agrarias*, 35(1), 555-566. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n1p555
- National Research Council (NRC). (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. Washington: The National Academies Press.

- Rodríguez-Muela, C., Rodríguez, H. E., Arzola, C., Díaz-Plascencia, D., Ramírez-Godínez, J. A., Flores-Mariñelarena, A., Mancillas-Flores, P. F., & Corral, G. (2015). Antioxidant activity in plasma and rumen papillae development in lambs fed fermented apple pomace. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2357-2362.
- SAS Institute (2011). *AS/STAT® 9.3 User's Guide*. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Schofield, P., Pitt, R. E., & Pell, A. N. (1994). Kinetics of Fiber Digestion from *In Vitro* Gas-Production. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2980-2991.
- Williams, B. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*, (Eds. Givens D. J., Owens E., Axford, R. F. E., & Omed) CAB International (p.p. 189-213). Wallingford: CAB International.
- Zerbini, E., Krishan, C. T., Victor, X. V. A., & Sharma, A. (2002). Composition and *in vitro* gas production of whole stems and cell walls of different genotypes of pearl millet and sorghum. *Animal Feed Science and Technology*, 98(1-2), 73-85. doi: 10.1016/S0377-8401(02)00018-4