

Efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 mediante la técnica de producción de gas *in vitro*

Areadne Sosa, Juana Galindo, R. Bocourt, R. Rodríguez, Nereida Albelo y A. Oramas

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana

Correo electrónico: asosa@ica.co.cu

Para determinar el efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, se realizó un experimento con dos ensayos, según diseño completamente aleatorizado, con el empleo de la técnica de producción de gas *in vitro*. Se evaluaron cinco tratamientos. En la primera etapa se compararon las dosis: 0, 0.5 y 1 mL de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de solución de incubación, y en la segunda: 0, 0.1 y 0.2 mL de cultivo en 80 mL de solución de incubación. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. En el primer estudio, las lecturas se realizaron cada tres horas hasta las 24 h de incubación y en el segundo, cada dos horas hasta las 77 h. En el caso de las dosis de 0, 0.1 y 0.2 mL, se determinaron los parámetros de la cinética de fermentación. Los resultados señalaron que la dosis adecuada del aditivo microbiano fue de 0.2 mL de cultivo en 80 mL de solución de incubación. Los valores de producción de gas alcanzados con este nivel de inclusión fueron superiores ($P < 0.001$) a los del control sin inocular. Esta dosis mostró mayor potencial de producción de gas, mayor velocidad de fermentación y menor fase lag, con respecto al control sin inocular. Los niveles de 0.5 y 1 mL de cultivo de *A. oryzae* provocaron una disminución en la producción de gas. Se sugiere que la adición de esta cepa de *A. oryzae*, en una dosis de 0.2 mL de cultivo en 80 mL de solución de incubación, es capaz de estimular la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en experimentos *in vitro*.

Palabras clave: aditivos microbianos, *Aspergillus oryzae*, producción de gas, alimentos fibrosos.

En lo que respecta a la nutrición animal, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de manipular el ecosistema ruminal y obtener mejoras en la eficiencia de los sistemas productivos. Una de las vías más explotadas es la utilización de aditivos (Carro y Ranilla 2002), y entre ellos los llamados aditivos microbianos, que consisten en preparados de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. El extracto de fermentación del hongo *Aspergillus oryzae* da lugar a diversas modificaciones en el rumen, las cuales mejoran la productividad animal e incrementan la ganancia de peso y la producción de leche (Humphry *et al.* 2002 y Kim *et al.* 2006). Con su utilización se han constatado incremento en las poblaciones microbianas ruminales, estabilización del pH ruminal, aumento de la degradabilidad de nutrientes y en las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (Gomez-Alarcon *et al.* 1991 y Humphry *et al.* 2002).

Los primeros estudios con este aditivo microbiano se realizaron en experimentos *in vivo*. Sin embargo, en las últimas décadas, se condujeron numerosas investigaciones para evaluar su efecto en condiciones *in vitro* (Wiedmeier *et al.* 1987 y Newbold *et al.* 1991). Estas técnicas simulan los procesos fermentativos y digestivos en el rumen, resultan menos costosas, requieren solo pequeñas cantidades de muestra, emplean menos tiempo para su realización y favorecen un mejor control de las condiciones experimentales (Fondevila y Barrios 2001 y López *et al.* 2007). En los últimos diez años, la técnica de producción de gas ha cobrado gran auge, ya que permite seguir fácilmente la evolución de la fermentación ruminal y se utiliza mucho para predecir el valor nutritivo de los alimentos (Rodríguez 2004), así como para determinar el efecto de sustancias empleadas

como aditivos (Marrero 2005, Hu *et al.* 2005, Colombatto *et al.* 2007 y Giraldo *et al.* 2008).

Este trabajo tuvo como objetivo determinar, mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, el efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115.

Materiales y Métodos

Preparación del material vegetal. Como sustrato se utilizó forraje de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, con 112 d de rebrote. Las plantas se sembraron en junio y estaban plenamente establecidas en un suelo ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 1999), sin riego ni fertilización. Se recolectaron, aproximadamente, 2 kg de tallos y hojas de 25 plantas tomadas al azar. El corte se realizó a 20 cm del suelo. El material recolectado se secó en estufa a 60 °C, durante 48 h. Se molió hasta tamaño de partícula de 1 mm. La MS fue de 23.5 %. La composición química del forraje se muestra en la tabla 1 y se determinó mediante los métodos descritos por Herrera *et al.* (1980).

Tabla 1. Composición química de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 empleado como sustrato.

Indicador	% Base Seca
PB	9.20
FDN	75.56
FDA	42.46
Celulosa	38.89
Lignina	5.85
Calcio	0.52
Fósforo	0.28
Cenizas	11.28

Obtención del líquido ruminal. Como animales donantes de contenido ruminal, se utilizaron dos toros mestizos Holstein x Cebú de 450 kg de peso promedio, canulados en rumen. Estos animales se mantuvieron en condiciones de estabulación y se alimentaron con una dieta de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 durante los 14 d previos a la toma de muestra. El líquido de rumen se extrajo a través de la cánula, con el empleo de una bomba de vacío, antes del consumo de alimento en el horario de la mañana, según la metodología descrita por Kamra y Agawal (2003). Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio en termos herméticamente cerrados, con capacidad para 750 mL. Posteriormente se filtraron a través de muselina.

Producción de gas *in vitro*. El experimento de producción de gas se realizó mediante la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se evaluaron cinco tratamientos. En el primer estudio, se compararon las dosis 0, 0.5 y 1.0 mL de cultivo de *A. oryzae*, en un volumen final de 80 mL de solución de incubación, y en el segundo 0, 0.1 y 0.2 mL de cultivo, en 80 mL de solución de incubación. En ambos se procedió según diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento. Se utilizó la cepa H/6.28.1 de *Aspergillus oryzae* de la colección del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Las unidades experimentales consistieron en 24 botellas de vidrio, de 100 mL de capacidad, que contenían 1 g de forraje de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 como sustrato, 10 mL del filtrado de líquido ruminal y 70 mL de solución amortiguadora (Menke y Steingass 1988). En cada tanda de incubación, se incluyeron botellas con la solución de incubación, pero sin sustrato. Estas se utilizaron como blancos para corregir el efecto del líquido ruminal en los volúmenes de gas producidos.

Las botellas selladas herméticamente se incubaron, colocándose de forma aleatoria en un baño de agua de temperatura controlada a 39° C. El volumen de gas producido se determinó pinchando el tapón de las botellas con una aguja hipodérmica, acoplada a una jeringa de 10 mL (error ± 0.1 mL). En el primer estudio, las lecturas se realizaron cada tres horas hasta las 24 h de incubación. En el segundo, se realizaron cada dos horas y la producción de gas se midió hasta las 77 h, para obtener más datos en el tiempo y determinar los parámetros de la cinética de fermentación mediante un modelo matemático.

Para la determinación de los parámetros de la cinética de fermentación, se ajustaron los datos de la producción de gas acumulada de cada botella al modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991):

$$Y = D * [1 - e^{-c(t-L)}]$$

donde,

Y = Producción de gas acumulada (mL de gas/ g de MS incubada).

D = Producción de gas acumulada potencial del tratamiento en las condiciones de incubación (asíntota de la curva, mL de gas/g MS incubada).

C = Velocidad de producción de gas (L h⁻¹).

t = Tiempo de incubación (h)

L = fase lag de la fermentación (h).

Análisis estadísticos. Los resultados experimentales se analizaron mediante el programa InfoStat versión 1.1 (InfoStat 2002). Para la comparación de las medias se utilizó la dócima de Duncan (1955) (P < 0.05). Para la estimación de los parámetros de la fermentación se utilizó el programa SPSS (Visauta 1998).

Resultados y Discusión

La producción de gas *in vitro*, como indicador de la actividad fermentativa, fue superior en el tratamiento donde no se incluyó *A. oryzae*, comparado con las dosis de 0.5 y 1.0 mL de cultivo en 80 mL de medio de incubación (tabla 2).

Tabla 2. Producción de gas acumulada (mL de gas/ g de MS incubada) de las muestras inoculadas con dosis de 0, 0.5 y 1.0 mL de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación.

Horas	Dosis de <i>A. oryzae</i> (mL de cultivo)			EE \pm y Sign.
	0	0.5	1.0	
4	3.54 ^a	2.64 ^b	2.51 ^b	0.27 *
7	11.38 ^a	9.58 ^b	9.22 ^b	0.37 **
10	21.58 ^a	17.06 ^b	16.83 ^b	0.42 ***
13	36.26 ^a	26.52 ^b	26.02 ^b	0.54 ***
22	59.22 ^a	45.27 ^b	43.54 ^b	0.81 ***
24	69.68 ^a	53.83 ^b	51.64 ^b	0.92 ***

^{a,b} Letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)

*p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

Al comparar el efecto entre las dos dosis que se emplearon en el presente estudio, se pudo verificar que no hubo diferencias entre ellas. Estas observaciones orientan hacia la necesidad de buscar dosis de *A. oryzae* que no disminuyan la capacidad fermentativa del rumen.

Arambel *et al.* (1987), Beharka y Nagaraja (1993) y Varel *et al.* (1993) utilizaron dosis similares en estudios *in vitro* con alimentos fibrosos e informaron aumento en la degradabilidad de la fibra, con la adición de *A. oryzae*. Las diferencias de los resultados que se obtuvieron en este estudio, con respecto a los informados por los autores antes citados, pueden tener su explicación en las diferencias que existen entre los sustratos que se emplearon, la naturaleza del producto utilizado o a las características de los animales donantes. En este sentido, se ha demostrado que una misma dosis de inclusión de *Aspergillus oryzae* provocaba respuestas diferentes, en dependencia del alimento utilizado (Beharka y Nagaraja 1993), como consecuencia de las diferentes poblaciones microbianas que predominan en el rumen con determinado alimento. Los sustratos utilizados por Arambel *et al.* (1987), Beharka y Nagaraja (1993) y Varel *et al.* (1993) consistieron en heno de alfalfa, *Bromus inermis* (Pasto bromo) y *Panicum virgatum* (Switchgrass), res-

pectivamente. En nuestro experimento se utilizó *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115. Con relación a la naturaleza del aditivo evaluado, puede decirse que en nuestro estudio se utilizó el cultivo de *A. oryzae*, mientras que los autores antes mencionados utilizaron un producto basado en el extracto de fermentación de este microorganismo. Las diferencias en el contenido ruminal de los animales donantes pudieran ser otra explicación de las divergencias encontradas. Beharka y Nagaraja (1993) utilizaron animales adaptados a una dieta con concentrado, por lo que la composición de la microbiota del contenido ruminal difiere de la del presente estudio donde los animales se adaptaron a una dieta totalmente fibrosa.

Se conoce que la utilización de dosis superiores a las adecuadas para un alimento específico, no incrementa la degradabilidad del sustrato, no provoca aumentos en las poblaciones de bacterias totales ni celulolíticas, y además puede disminuir el número de bacterias proteolíticas (Martín y Nisbet 1990 y Oellermann *et al.* 1990). Higginbotham *et al.* (2004), al evaluar el efecto de *A. oryzae* en la fermentación ruminal en condiciones *in vivo*, encontraron que al adicionar dosis superiores a los 3 g por día, no se obtenían mejoras en la producción de leche ni en los indicadores ruminales.

Los resultados del estudio anterior condujeron al diseño de un segundo ensayo, en el cual se compararon dosis más bajas de inclusión de *A. oryzae*.

En la tabla 3 se muestra la producción de gas acumulada (mL de gas/ g de MS incubada), cuando se emplearon dosis de 0, 0.1 y 0.2 mL de cultivo de *A. oryzae*. Los mejores resultados se observaron con la dosis de 0.2 mL de cultivo.

Estos resultados coinciden con los informados por Gómez-Alarcón *et al.* (1990), quienes al utilizar concentraciones similares de *A. oryzae* en experimentos *in vitro*, encontraron que aumentaba la digestibilidad de tres sustratos fibrosos.

En este estudio también se corroboró que se podía obtener una respuesta positiva por la adición directa del cultivo del hongo a sistemas *in vitro*, en contraste con lo informado por Arambel *et al.* (1987), quienes plantearon que para reproducir *in vitro* el efecto de *A. oryzae*, el inóculo se tiene que obtener de animales adaptados al aditivo.

Tabla 3. Producción de gas acumulada (mL de gas/ g de MS incubada) de las muestras inoculadas con dosis de 0, 0.1 y 0.2 mL de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación

Horas	Dosis de <i>A. oryzae</i> (mL de cultivo)			
	0	0.5	1.0	EE ± y Sign.
3.5	1.03	1.61	1.98	0.24
5.5	4.57 ^a	5.36 ^{ab}	6.34 ^b	0.32*
7.5	9.01 ^a	10.65 ^b	11.73 ^c	0.32***
9.5	15.03 ^a	16.62 ^b	17.80 ^c	0.35***
11.5	20.68 ^a	22.37 ^b	23.83 ^b	0.51**
13.5	29.19 ^a	30.78 ^{ab}	32.86 ^b	0.73*
15.5	41.95	43.72	45.44	1.15
17.5	54.63	56.48	58.67	1.08
21	72.38 ^a	75.26 ^{ab}	77.98 ^b	1.07*
24	86.44 ^a	89.10 ^{ab}	92.64 ^b	1.09*

^{a,b,c} Letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)

*p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

Los parámetros cinéticos de la fermentación *in vitro* de los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 4.

La dosis de 0.2 mL mostró mayor potencial de producción de gas y menor fase lag que el control sin inocular. La velocidad de producción de gas fue prácticamente igual para los tres tratamientos. Este resultado sugiere que la adición de *A. oryzae* favorece la utilización del sustrato y disminuye el tiempo requerido para su colonización por los microorganismos ruminales.

Se seleccionó el modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991), pues en este se asume que la biomasa se produce en proporción con el sustrato degradado y que la producción de gas es proporcional a la cantidad de sustrato degradado. Este difiere de otros modelos, en los que se asume que la biomasa es independiente del sustrato, que la velocidad de crecimiento de los microorganismos se mantiene constante, o que la producción de gas es independiente del sustrato.

Además, al analizar los criterios de bondad de ajuste del modelo (tabla 4), puede observarse que estos son adecuados. En la figura 1 se muestra el comportamiento de los valores reales obtenidos y los estimados, según el modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la fermentación ruminal *in vitro* de muestras inoculadas con dosis de 0, 0.1 y 0.2 mL de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación

Indicadores	Dosis de <i>A. oryzae</i> (mL de cultivo)		
	0	0.1	0.2
D ± EE (mL de gas g de MS incubada)	240.77 ± 10.44	238.31 ± 9.40	245.80 ± 9.54
C ± EE (L h ⁻¹)	0.021 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002
L ± EE (h)	4.04 ± 0.34	3.89 ± 0.32	3.84 ± 0.32
R ² y Sign.	0.98 ***	0.98 ***	0.98***
MS error	72.81	67.87	73.42

D: Producción de gas acumulada potencial del tratamiento en las condiciones de incubación, c: velocidad de producción de gas, t: tiempo de incubación y L: fase lag de la fermentación.

*** p < 0.001

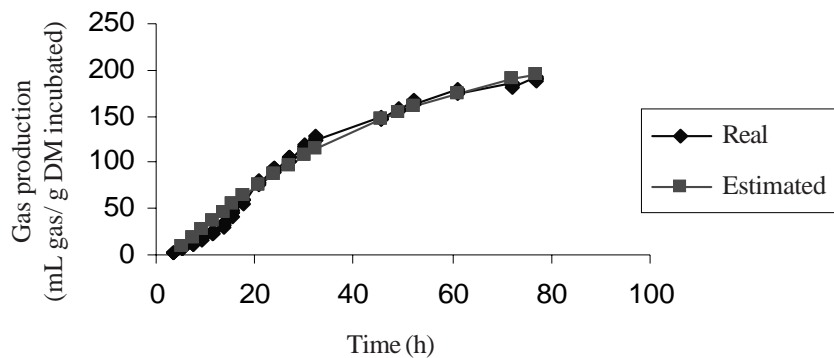


Figura 1. Ajuste de los valores reales obtenidos a los estimados por el modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991) para el caso de la dosis de 0.2 mL de cultivo de *A. oryzae*.

La correspondencia entre ambas series de valores muestra que el modelo seleccionado explica adecuadamente el comportamiento de los datos reales.

La producción de gas constituye un indicador muy utilizado para predecir la digestibilidad de los alimentos (Mota *et al.* 2005 y Rodríguez *et al.* 2007) y evaluar el efecto de aditivos, como los extractos vegetales (Hu *et al.* 2005 y Soliva *et al.* 2005), enzimas fibrolíticas (Colombatto *et al.* 2007 y Giraldo *et al.* 2008) y aditivos microbianos (Lee *et al.* 2004 y Marrero 2005).

Aunque no se han encontrado estudios previos, en los que se emplee la técnica de producción de gas para evaluar la acción de *A. oryzae*, numerosos estudios *in vitro* demuestran la influencia positiva de este hongo en la fermentación ruminal (Arambel *et al.* 1987, Wiedmeier *et al.* 1987 y Newbold *et al.* 1991). Los resultados de estos autores, en cuanto a la producción de gases y a los productos finales de la fermentación, son variables. La variación entre estudios similares pudiera estar relacionada con las diferencias en el tipo y concentración de aditivo microbiano, sustrato, así como en las condiciones de cultivo usadas.

Se sugiere que la adición de la cepa de *A. oryzae*, utilizada en una dosis de 0.2 mL de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación, es capaz de estimular la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en experimentos *in vitro*. Se recomienda estudiar el efecto de este microorganismo en otros indicadores, como las poblaciones microbianas y los productos finales de la fermentación.

Referencias

Arambel, M.J., Wiedmeier, R.D. & Walters, J.L. 1987. Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* rumen fermentation. *Nutr. Rep. Int.* 35:433

Beharka, A.A. & Nagaraja, T.G. 1993. Effect of *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract (Amaferm) on *in vitro* Fiber Degradation. *J. Dairy Sci.* 76:812

Carro, M.D. & Ranilla, M.J. 2002. Situación actual y posibles alternativas a los aditivos APC. *Albéitar*. No. 56, Zaragoza, España. p.46

Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K. & Owen, E. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and

incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. Tech.* 137:150

Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics.* 11:1

Fondevila, M. & Barrios, A. 2001. La técnica de producción de gas y su aplicación al estudio del valor nutritivo de los forrajes. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 35:197

Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J. & Carro, M.D. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 141:306

Gomez-Alarcon, R.A., Dudas, C. & Huber, J.T. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73:703

Gomez-Alarcon, R.A., Huber, J.T., Higginbotham, G.E., Wiersma, F., Ammon, D. & Taylor, B. 1991. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk yields, eating patterns and body temperatures of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 69:1733

Hernández, A., Pérez, J.M. & Bosch, D. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. *AGRINFORMINAGRI*. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 26

Herrera, R.S., González, S.B., Hardy, C., Pedroso, D.M., García, M., Senra, A., Ríos, C., García, R., Irigoyen, E. & Cuesta, A. 1980. Evaluación química de pastos, forrajes y heno. En: *Análisis Químico de los Pastos. Metodología para las tablas de su composición*. Eds. Herrera, R.S., González, S.B., Hardy, C. y Pedroso, D.M. Ciudad de la Habana, Cuba, p. 23

Higginbotham, G.E., Santos, J.E.P., Juchem, S.O. & De Peters, E.J. 2004. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* extract on milk production and rumen parameters. *Livest. Prod. Sci.* 86:55

Hu, W.L., Liu, J.X., Ye, J.A., Wu, Y.M. & Guo, Y.Q. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 120:333

Humphry, J. B., Coffey, K.P., Moyer, J.L., Brazle, F.K. & Lomas, L.W. 2002. Intake, digestion, and digestive characteristics of *Neotyphodium coenophialum*-infected and uninfected fescue by heifers offered hay diets supplemented with *Aspergillus oryzae* fermentation extract or laidlomycin propionate. *J. Anim. Sci.* 80:225

InfoStat. 2002. InfoStat professional. Versión 1.1 Universidad de Córdoba. Estadística y Diseño- F.C.A. Córdoba. Argentina.

- Kamra, D.N. & Agawal, N. 2003. Sampling of Rumen Contents. En: Techniques in rumen microbiology. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar 243 122, India, p. 7
- Kim, H.S., Ahn, B.S., Chung, S.G., Moon, Y.H., Ha, J.K., Seo, I.J., Ahn, B.H. & Lee, S.S. 2006. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. Anim. Feed Sci. Tech. 126:23
- Krishnamoorthy, U., Soller, H., Steingass, H. & Menke, K.H. 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 65:28
- Lee, S.S., Choi, C.K., Ahn, B.H., Moon, Y.H., Kim, C.H. & Ha, J.K. 2004. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. Anim. Feed Sci. Tech. 115:215
- López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E. & France, J. 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. Anim. Feed Sci. Tech. 135:139
- Marrero, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis de Doctor. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba. 114p.
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1990. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganism *in vitro*. J. Anim. Sci. 68:2142
- Menke, K.H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:1
- Mota, M., Rodríguez, R., Solanas, E. & Fondevila, M. 2005. Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: Comparison of *in vitro* gas production with other methods to determine N degradability. Anim. Feed Sci. Tech. 123:341
- Newbold, C.J., Brock, R. & Wallace, R.J. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agr. Sci. 116:159
- Oellermann, S.O., Arambel, M.J., Kent, B.A. & Walters, J.L. 1990. Effect of graded amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. J. Dairy Sci. 73:2413
- Rodríguez, R. 2004. Uso de la técnica de producción de gas *in vitro* en la valoración nutritiva de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbekoides*, *Acacia cornigera* y *Enterolobium cyclocarpum*. Master Science Thesis. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. 80 pp.
- Rodríguez, R., Mota, M., Fondevila, M. & de la Fuente, G. 2007. *In vitro* fermentation of four tropical browse legumes: estimation of the effect of tannins by gas production. En: Herbivores-Assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Eds. Sandoval-Castro, C.J., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A.J. and Hovell, F.D. de B. BSAS Occasional Publication. No. 34 p.101
- Soliva, C.R., Kreuzer, M., Foidl, N., Foidl, G., Machmüller, A. & Hess, H.D. 2005. Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation *in vitro*. Anim. Feed Sci. Tech. 118:47
- 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 ruminants feed. Anim. Feed. Sci. Tech. 48:185
- Varel, V.H., Kreikemeier, K.K., Jung, H.G. & Hatfield, R.D. 1993. *In vitro* Stimulation of Forage Fiber Degradation by Ruminal Microorganisms with *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract. Appl. Environ. Microbiol. 59:3171
- Visauta, B. 1998. SPSS para Windows. Estadística multivariada. Vol. II. Mc Graw-Hill/Interamericana de España. Sav. p. 358.
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. & Walters, J.L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063

Recibido: 23 de marzo de 2008