

## 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 la aplicación de la técnica de producción de gas *in vitro*. Se evaluaron cinco tratamientos. En la primera etapa del experimento se compararon las dosis de 0, 500 y 1000  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de solución de incubación, y en la segunda 0, 100 y 200  $\mu$ L de cultivo en 80 mL de solución de incubación. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. En la primera etapa, las lecturas se realizaron cada tres horas hasta las 24 h de incubación, y en la segunda cada dos horas hasta las 77 h. En las dosis de 0, 100 y 200  $\mu$ L se determinaron los parámetros de la cinética de fermentación. Los resultados señalaron que la dosis adecuada del aditivo microbiano fue la de 200  $\mu$ L de cultivo en 80 mL de solución de incubación. Los valores de producción de gas alcanzados con esta 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. Las dosis de 500 y 1000  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae* provocaron disminución de la producción de gas. Se sugiere que la adición de esta cepa de *A. oryzae*, en una dosis de 200  $\mu$ L de cultivo en 80 mL de solución de incubación, fue capaz de estimular la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en experimentos *in vitro*.

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

Entre las investigaciones en 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), específicamente los llamados aditivos microbianos.

Estos aditivos consisten en preparados de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. La utilización del extracto de fermentación del hongo *Aspergillus oryzae* provoca modificaciones en el rumen, que tienen como consecuencia incremento de la degradabilidad de la fibra y aumento en las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (Gomez-Alarcon *et al.* 1990, Beharka y Nagaraja 1993, Varel *et al.* 1993, Varel y Kreikemeier 1994 y Di Francia *et al.* 2008). Esta estimulación de la fermentación ruminal se traduce en mejoras en la productividad animal e incremento en la ganancia de peso y la producción de leche (Humphry *et al.* 2002 y Kim *et al.* 2006).

Los primeros estudios con este aditivo microbiano se realizaron en experimentos *in vivo*. Sin embargo, en las últimas décadas, numerosos estudios se condujeron para evaluar su efecto en condiciones *in vitro* (Wiedmeier *et al.* 1987 y Newbold *et al.* 1991). Estas técnicas que simulan los procesos fermentativos y digestivos en el rumen resultan menos costosas, ya que requieren solo pequeñas cantidades de muestra, emplean menos tiempo para su realización y favorecen el mejor control de las condiciones experimentales (Fondevila y Barrios 2001, López *et al.* 2007 y Fondevila y Pérez-Espés 2008). La técnica de producción de gas ha experimentado gran auge en los últimos diez años, ya que permite seguir fácilmente la evolución de la fermentación ruminal, y es muy utilizada para predecir el valor nutritivo de los ali-

mentos (Mota *et al.* 2005, Rodríguez *et al.* 2007 y Rodríguez *et al.* 2009), así como para determinar el efecto de aditivos, como son los ácidos orgánicos (Li *et al.* 2010), extractos vegetales (Hu *et al.* 2005, Soliva *et al.* 2005 y Kongmun *et al.* 2010)), enzimas fibrolíticas (Colombatto *et al.* 2007, Giraldo *et al.* 2008 y Ranilla *et al.* 2008) y aditivos microbianos (Lee *et al.* 2004 y Marrero 2005).

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, de 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, realizando el corte a 20 cm del suelo. El material recolectado se secó en estufa a 60° C durante 48 h. Se molió hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. La MS fue de 23.5 %. La composición química del forraje (tabla 1) se determinó mediante los métodos descritos por Herrera *et al.* (1980).

**Obtención del líquido ruminal.** Como animales donantes del 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

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

Indicador	Base seca %
PB	9.2
FDN	75.56
FDA	42.46
Celulosa	38.89
Lignina	5.85
Calcio	0.52
Fósforo	0.28
Cenizas	11.28

de rumen se extrajo a través de la cánula, con la utilización de una bomba de vacío, antes del consumo de alimento y durante el horario de la mañana, según la metodología descrita por Kamra y Agawal (2003). Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio en termos con capacidad para 750 mL, herméticamente cerrados. Después 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 un primer estudio se compararon las dosis 0, 500 y 1000  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae* en un volumen final de 80 mL de solución de incubación, y en un segundo estudio 0, 100 y 200  $\mu$ L de cultivo en 80 mL de solución de incubación, ambos 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, se colocaron de forma aleatoria en un baño de agua a temperatura controlada de 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  $\pm$ 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)

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). 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*, con respecto a las dosis de 500 y 1000  $\mu$ L 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, 500 y 1000  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación.

Horas	Dosis de <i>A. oryzae</i> ( $\mu$ L de cultivo)			EE $\pm$ Sign.
	0	500	1000	
4	3.54 <sup>a</sup>	2.64 <sup>b</sup>	2.51 <sup>b</sup>	0.27*
7	11.38 <sup>a</sup>	9.58 <sup>b</sup>	9.22 <sup>b</sup>	0.37**
10	21.58 <sup>a</sup>	17.06 <sup>b</sup>	16.83 <sup>b</sup>	0.42***
13	36.26 <sup>a</sup>	26.52 <sup>b</sup>	26.02 <sup>b</sup>	0.54***
22	59.22 <sup>a</sup>	45.27 <sup>b</sup>	43.54 <sup>b</sup>	0.81***
24	69.68 <sup>a</sup>	53.83 <sup>b</sup>	51.64 <sup>b</sup>	0.92***

<sup>ab</sup> 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 utilizaron en este estudio, se verificó que no hubo diferencias. Esta observación orienta 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*. La diferencia de los resultados de este experimento, con respecto a lo obtenido por los autores citados puede explicarse por las diferencias

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* provoca respuestas diferentes, en dependencia del alimento utilizado (Beharka y Nagaraja 1993), como consecuencia de las diferentes poblaciones microbianas que predominan en el rumen con un alimento determinado. 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), respectivamente. En este experimento se utilizó *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115. Con respecto a la naturaleza del aditivo evaluado, se utilizó el cultivo de *A. oryzae*, mientras que los autores citados 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 diferencias 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 con respecto a la del presente estudio, donde los animales se adaptaron a una dieta totalmente fibrosa.

Se conoce que el empleo de dosis superiores a las adecuadas para un alimento específico no incrementa la degradabilidad del sustrato, no provoca aumento en las poblaciones de bacterias totales ni celulolíticas, y 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/d, no se obtuvieron mejoras en la producción de leche y tampoco en los indicadores ruminales.

Los resultados del estudio condujeron a diseñar 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, 100 y 200  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae*. Los mejores resultados se observaron con la dosis de 200  $\mu$ L de cultivo.

Estos resultados coinciden con los informados por Gomez-Alarcon *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, 100 y 200  $\mu$ L de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación

Horas	Dosis de <i>A. oryzae</i> ( $\mu$ L de cultivo)			
	0	100	200	EE $\pm$ y Sign.
3.5	1.03	1.61	1.98	0.24
5.5	4.57 <sup>a</sup>	5.36 <sup>ab</sup>	6.34 <sup>b</sup>	0.32*
7.5	9.01 <sup>a</sup>	10.65 <sup>b</sup>	11.73 <sup>c</sup>	0.32***
9.5	15.03 <sup>a</sup>	16.62 <sup>b</sup>	17.80 <sup>c</sup>	0.35***
11.5	20.68 <sup>a</sup>	22.37 <sup>b</sup>	23.83 <sup>b</sup>	0.51**
13.5	29.19 <sup>a</sup>	30.78 <sup>ab</sup>	32.86 <sup>b</sup>	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 <sup>a</sup>	75.26 <sup>ab</sup>	77.98 <sup>b</sup>	1.07*
24	86.44 <sup>a</sup>	89.10 <sup>ab</sup>	92.64 <sup>c</sup>	1.09*

<sup>ab</sup> 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* en los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 4. Se seleccionó el modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991), pues en este se asume que la biomasa se produce en proporción al sustrato degradado, y que la producción de gas es proporcional a la cantidad de sustrato degradado, a diferencia 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) se puede observar que son apropiados.

En la figura 1 se muestra el comportamiento de los valores reales obtenidos y los estimados, según el modelo de Krishnamoorthy *et al.* (1991). La correspondencia entre ambas series de valores muestra que el modelo seleccionado explica adecuadamente el comportamiento de los datos reales.

La dosis de 200  $\mu$ L evidenció 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.

En este estudio, la estimulación de la fermentación ruminal, a partir de la adición de *Aspergillus oryzae*, podría ser por acción del hongo sobre el sustrato o determinadas poblaciones ruminales. Varel *et al.* (1993) relacionaron los incrementos en la degradabilidad de la fibra con la presencia de esterases en *A. oryzae*, que remueven los ésteres de ácidos fenólicos de la pared celular de las plantas. Beharka y Nagaraja (1993)

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la fermentación ruminal *in vitro* de muestras inoculadas con dosis de 0, 100 y 200  $\mu\text{L}$  de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación

Parámetros	Dosis de <i>A. oryzae</i> ( $\mu\text{L}$ de cultivo)		
	0	100	200
D (mL de gas/g de MS incubada)	240.77 $\pm$ 10.44	238.31 $\pm$ 9.40	245.80 $\pm$ 9.54
C ( $\text{h}^{-1}$ )	0.021 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.002
L (h)	4.04 $\pm$ 0.34	3.89 $\pm$ 0.32	3.84 $\pm$ 0.32
R <sup>2</sup> y Sign.	0.98 ***	0.98 ***	0.98 ***
CM 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

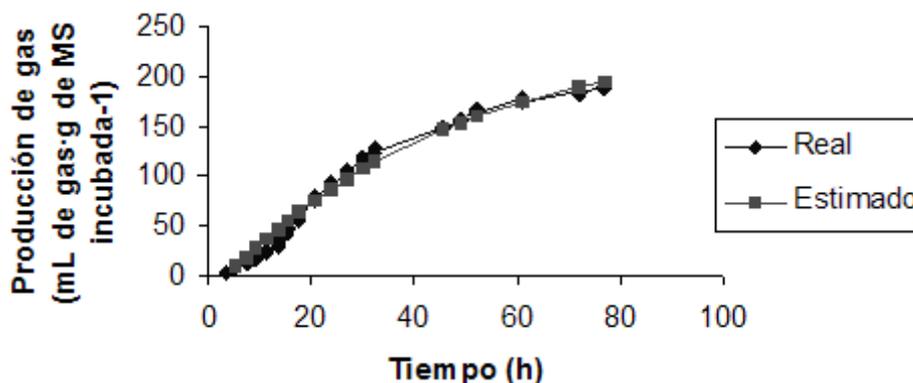


Figura 1. Ajuste de los valores reales obtenidos a los estimados por el modelo propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991) para el caso de la dosis de 200  $\mu\text{L}$  de cultivo de *A. oryzae*.

demonstraron que la degradación de la fibra está relacionada con la estimulación de la actividad bacteriana en el rumen.

Se sugiere que la adición de la cepa de *A. oryzae*, utilizada en una dosis de 200  $\mu\text{L}$  de cultivo de *A. oryzae* en 80 mL de medio de incubación, estimula 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. *Albítar*. 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
- Di Francia, A., Masucci, F., De Rosa, G., Varricchio, M.L. & Proto, V. 2008. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140:67
- 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. Agríc.* 35:197
- Fondevila, M. & Pérez-Espés, B. 2008. A new *in vitro* system to study the effect of liquid phase turnover and pH on microbial fermentation of concentrate diets for ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144:196
- 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
- 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
- Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P. & Navanukraw, C. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. Livest. Sci. 127:38
- 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
- Li, X.Z., Long, R.J., Yan, C.G., Choi, S.H., Jin, G.L. & Song, M.K. 2010. Rumen microbial responses in fermentation characteristics and production of CLA and methane to linoleic acid in associated with malate or fumarate. Anim. Feed Sci. Tech. 155:132
- 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 Dr. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 114 pp.
- 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
- Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Giraldo, L.A., Tricárico, J.M. & Carro, M.D. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on *in vitro* ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. Anim. Feed Sci. Tech. 145:109
- Rodríguez, R., Fondevila, M. & Castrillo, C. 2009. *In vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* CT-115 supplemented with four tropical browse legume species. Anim. Feed Sci. Tech. 151:65
- 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. Sandoval-Castro, C.J., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A.J. and Hovell, F.D. de B. Eds. 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. 1994. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on *in situ* fiber degradation, ruminal fermentation, and microbial protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or bromegrass hay. J. Anim. Sci. 72:1814
- 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: 20 de abril de 2009**



## Instituto de Ciencia Animal

Escuela de Postgrado

### **Programas de postgrado**

#### **Estudios conducentes a grado científico**

##### **Doctorado**

➤ **Programa Doctoral Colaborativo en Producción Animal**

Coordinador: Dra. Elaine Valiño Cabrera

Correo electrónico: evalino@ica.co.cu

➤ **Programa Doctoral Colaborativo en Biometría**

Coordinador: Dra. Verena Torres Cárdenas

Correo electrónico: vtorres@ica.co.cu

➤ **Doctorado tutelar**

#### **Estudios conducentes a grado académico**

##### **Maestría**

➤ **Maestría en Producción Animal para la Zona Tropical**

Coordinador: Dra. Esmeralda Lon Wo

Correo electrónico: elonwo@ica.co.cu

### **Requisitos de ingreso**

Los puede encontrar en la web del Instituto  
[www.ica.inf.cu](http://www.ica.inf.cu)

#### **Para mayor información:**

Nidia Fernández Ontivero

[nfernandez@ica.co.cu](mailto:nfernandez@ica.co.cu)