

Evaluación de la ensilabilidad *in vitro* de granos de canavalia (*Canavalia ensiformis*) y vigna (*Vigna unguiculata*), solos o mezclados con granos de sorgo (*Sorghum bicolor*)

L.A. González¹, Sandra Hoedtke², A. Castro¹ y Annette Zeyner²

¹Research Centre of Agriculture and Animal Science, Central University of Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½, Villa Clara, Cuba

²Chair for Nutrition Physiology and Animal Nutrition, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 8, 18059 Rostock, Germany

Correo electrónico: luisgd@uclv.edu.cu

Los granos de canavalia (*Canavalia ensiformis*), vigna (*Vigna unguiculata*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) son una alternativa de alimentación para cerdos en el trópico. Sin embargo, es una necesidad estudiar el ensilaje como método de conservación. Se analizaron químicamente los granos maduros de canavalia y vigna y la ensilabilidad se comprobó por la Prueba de Fermentación Rostock (PFR). La capacidad tampón fue 8.9, 6.3 y 3.1 g de ácido láctico/100 g MS para canavalia, vigna y sorgo, respectivamente. Para la PFR, se incubaron 50 g de granos molidos con 200 mL de agua desionizada (30 °C). Las variantes se realizaron por triplicado: control sin aditivo, miel (4 %), *Lactobacillus plantarum* (3x10⁵ ufc/g), miel + *Lactobacillus plantarum*. Asimismo, el sorgo se mezcló con granos de leguminosas. El pH se midió a las 0, 14, 18, 22, 26 y 38 h, y se analizó el ácido láctico, los AGV, el alcohol y el NH₃ en los filtrados después de 38 h. El menor pH (P < 0.05) a las 38 h se determinó en canavalia + *Lactobacillus plantarum* + miel, canavalia + *Lactobacillus plantarum* + sorgo, vigna + *Lactobacillus plantarum*, vigna + *Lactobacillus plantarum* + miel, y vigna + *Lactobacillus plantarum* + sorgo. La mayor producción de ácido láctico (P < 0.05) y los menores niveles de ácido acético y ácido butírico, así como de NH₃ (P < 0.05) se determinaron para vigna + *Lactobacillus plantarum*, y vigna + *Lactobacillus plantarum* + miel. La PFR reveló la necesidad de inocular *Lactobacillus plantarum* y adicionar miel para una suficiente acidificación. Los ensilajes mixtos son una opción al cosechar granos de sorgo con elevada humedad.

Palabras clave: canavalia, vigna, sorgo, ensilabilidad *in vitro*, Prueba de Fermentación Rostock.

Muchas de las leguminosas subutilizadas tales como la canavalia (*Canavalia ensiformis*) y la vigna (*Vigna unguiculata*) contienen cantidades adecuadas de proteínas, amino ácidos esenciales, ácidos grasos poli-insaturados, fibra dietética y minerales y vitaminas esenciales comparables con otras leguminosas comunes. Ellas se adaptan a adversas condiciones ambientales y pueden progresar bajo extremas condiciones de estrés (Amubode y Fetuga 1983, Sotelo *et al.* 1999 y Bhat *et al.* 2008). Además, las leguminosas se caracterizan por la habilidad de fijar nitrógeno en el suelo y en sus tejidos y, por lo tanto, se consideran plantas valiosas.

El ensilaje se considera una técnica promisoriosa en la conservación y mejoramiento del valor nutritivo del alimento (Liener 1962, Gomez-Brenes *et al.* 1988 y Belmar *et al.* 1999). Es útil particularmente para procesar semillas duras de leguminosas, mejorar la digestibilidad a través de la reducción de la flatulencia del frijol y la eliminación de factores anti-nutricionales, como por ejemplo los inhibidores de tripsina (Deshpande y Salunkhe 2000). La fermentación de una mezcla cereal-leguminosa es beneficiosa en lo que respecta a la complementación del contenido de aminoácidos. A menudo, los aminoácidos que contienen azufre como son la metionina y la cistina se encuentran en cantidades limitadas en las leguminosas, mientras que las proteínas de los cereales son generalmente deficientes en lisina (Deshpande y Salunkhe 2000). Por lo tanto, el ensilaje combinado de granos de cereales y leguminosas se puede considerar como una posibilidad al cosechar y preservar

granos maduros con alto contenido de humedad, lo que representa, al mismo tiempo, una dieta completa.

Al evaluar la ensilabilidad de los alimentos, el escalado desde el nivel del campo hasta el de una unidad experimental con ensilajes modelo permite una evaluación del proceso de ensilaje. Por lo tanto, se ha asumido que los silos de pequeña escala brindan una predicción confiable del proceso de fermentación a escala de granja (Wilson y Wilkins 1972, McDonald *et al.* 1991 y Cherney y Cherney 2003). Además de ser una técnica que consume tiempo, los ensilajes modelo requieren frecuentemente de una gran capacidad de almacenamiento y del esfuerzo del operador durante la elaboración, lo que depende del número de unidades experimentales en evaluación (Hoedtke y Zeyner 2011). Por el contrario, los métodos *in vitro* se caracterizan generalmente por una elevada capacidad de procesamiento de las muestras y menor tiempo. En el campo del ensilaje, Pieper *et al.* (1989) desarrollaron una prueba de ensilabilidad *in vitro* y Zierenberg (2000) una avanzada, para predecir la necesidad de aditivos en el ensilaje según el material vegetal que se va a ensilar. El principio del método es la acidificación del material pulverizado en soluciones acuosas. La Prueba de Fermentación Rostock (PFR) se distingue por un procedimiento simple, la posibilidad de examinar un amplio rango de tratamientos contemporáneos y una capacidad de resultados en corto período de tiempo. Por esta razón, se utilizó la PFR para investigar las características de ensilabilidad de los granos de canavalia

y vigna, solos o mezclados con granos de sorgo.

Materiales y Métodos

Material vegetal. Se cosecharon manualmente granos de canavalia (*Canavalia ensiformis* L. DC, JBN) completamente maduros, vigna (*Vigna unguiculata* L. Walp., CWP) var. INIFAT-93 y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench, SOR) var. CIAP-2E de pequeñas parcelas sembradas en suelo pardo carbonatado en cantidades correspondientes a las necesidades de la Estación Agrícola Experimental "Álvaro Barba" (Universidad Central de Las Villas). No se utilizó fertilizantes ni riego. Todos los granos se secaron al sol y se almacenaron en bolsas de nailon antes del análisis.

Análisis químico. La MS se determinó a través del secado en estufa a 105 °C por 3 h. Le siguió el incinerado a 600 °C por 5 h en una mufla. La PC ($N \times 6.25$) se analizó mediante Kjeldatherm y Vapodest (Gerhardt, Königswinter, Germany; Kjeldahl 1883). La FND (ceniza residual exclusiva) y la FAD (ceniza residual exclusiva) se determinaron por análisis químico húmedo (Goering y van Soest 1970) y la FC (VDLUF 1993) se determinó con un analizador FOSS (Fibertec 2010, Rellingen, Alemania). Los carbohidratos solubles en agua (CSA) se analizaron como azúcares monoméricos y diméricos en extractos de agua (1 h a 25 °C) por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, HPX-87C, Biorad, Hercules, CA, USA), según Menge-Hartmann *et al.* (2009), con una tasa de flujo de 0.65 mL/min en un detector de índice de refracción (temperatura de la columna 80 °C). Se escogió un procedimiento enzimático con amilasa (Thermamyl 120, Novo Nordisk A/S, Denmark) para determinar el almidón (Schmidt *et al.* 2005). La concentración de glucosa se midió por HPLC, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, y el contenido de almidón se calculó según el contenido de carbohidrato soluble en agua determinado previamente (glucosa). La capacidad tampón se analizó a través de la determinación con ácido láctico (0.1 mol/L) a un pH de 4.0 (Weißbach 1967).

Prueba de Fermentación Rostock (PFR). Los granos se molieron a 4mm para realizar la PFR (Pieper *et al.* 1989 y Zierenberg 2000). Se mezclaron 500 g del material molido con 200 mL de agua desionizada

en vasos de precipitado de cristal de 600 mL de capacidad. Se aplicaron aditivos cuando fue necesario y se realizaron las siguientes variantes (n=3): control sin aditivo, mieles (4 %), *Lactobacillus plantarum* (3×10^5 ufc/g, DSM 8862 y 8866), miel + *Lactobacillus plantarum*. Asimismo, el sorgo se mezcló con los granos de leguminosas para alcanzar 20 % de PC en la mezcla (tabla 1). Los vasos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron en una incubadora a 30 °C. El pH se midió después de 0, 14, 18, 22, 26 y 38 h con un analizador calibrado de pH y electrodos de cristal de referencia (precisión 0.01, temperatura de compensación 0-70 °C). Antes de cada medición, se revolvió cada muestra manualmente con un dispositivo de cristal. El electrodo de pH se desinfectó (alcohol 70 %) entre las mediciones para evitar la contaminación bacteriana por diferentes formas.

Los productos de la fermentación se analizaron en los extractos filtrados después de las 38 h. El ácido láctico se determinó por HPLC (Aminex HPX-87H, Biorad) con una tasa de flujo de 0.60 mL/min en el detector UV. Los ácidos grasos de cadena corta y el etanol se cuantificaron por separado mediante cromatografía de gas (GC-14A, CLASS-VP, Shimadzu, Kioto, Japón). El N se utilizó como gas conductor a una presión de 1 kg/cm². La temperatura del inyector y el detector de ionización de flama se mantuvo constante a 190 °C cada uno; la temperatura de la columna de la estufa se programó a 110 °C durante los primeros 1.5 min, y después se incrementó a 170 °C a razón de 12 °C/min. El amoníaco se determinó en los filtrados por la técnica de micro-difusión modificada (Voigt y Steger 1967).

Análisis Estadístico. Los resultados se analizaron por el programa computarizado SPSS 19.0 (SPSS 19.0© para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para investigar el efecto de los tratamientos en la cinética del pH y los parámetros de fermentación mediante la prueba de Duncan para la homogeneidad de la varianza o la prueba Dunnett-T3 test sin homogeneidad de la varianza. Los resultados se muestran como valores medios (\pm DE) y el nivel de significación se preestableció a $P < 0.05$. Se utilizó un modelo lineal general (univariado) para descubrir interacciones entre los tratamientos y el tiempo

Tabla 1. Variantes usadas en la Prueba de Fermentación de Rostock.

Variantes	Mieles (4%)	Bacterias ácido lácticas (3×10^5 ufc/g)	Sorgo (20% PC en la MS)
LEG			
LEG+MOL	+		
LEG+SOR			+
LEG + Bacterias ácido lácticas	+	+	
LEG + Bacterias ácido lácticas +Mieles	+	+	
LEG + Bacterias ácido lácticas +SOR		+	+

ufc – unidades formadoras de colonia; PC – proteína cruda; MS – materia seca; LEG – granos de leguminosa (canavalia o vigna); SOR- granos de sorgo

de fermentación en el pH durante la PFR.

Resultados y Discusión

La composición química de los granos de canavalia, vigna y sorgo se muestra en la tabla 2.

Todas las fracciones crudas están dentro del rango de valores tabulados (Ensminger 1992, Cáceres *et al.* 1995, Ekanayake *et al.* 2000, y Sridhar y Seena 2006).

Según McDonald *et al.* (1991), las leguminosas están consideradas inapropiadas para el ensilaje debido a tres factores principales: son altamente tamponantes, tienen bajo contenido de CSA, y de MS como pastos. En el caso de la vigna, se observaron bajas cantidades de CSA, mientras que en la canavalia, estos no se determinaron (tabla 3). Especialmente alta capacidad tampón (9.0 y 6.3 g ácido láctico/100 g MS en canavalia y vigna, respectivamente) se determinó en las leguminosas, porque, debido a los elevados contenidos de proteína, las leguminosas son más tamponantes que las gramíneas (McDonald y Henderson 1962, y McDonald *et al.* 1991), lo que sucedió en la canavalia y la vigna, comparadas con el sorgo (3.1 g ácido láctico/100 g MS). La relación entre la CSA y la capacidad tampón mostró que la canavalia (0.0) tuvo características de ensilabilidad más desfavorables comparada con la vigna con 0.4 (tabla 3). Las fracciones de todos los granos estuvieron por debajo de 2, lo que estuvo en correspondencia con Weißbach (1967) acerca del valor mínimo para obtener una buena calidad de fermentación. Sin embargo, se esperaba una mayor ensilabilidad para la vigna que para la canavalia.

El maíz, la cebada, la avena, el trigo y el mijo se han usado como aditivos en un intento de mejorar tanto la calidad de la fermentación como el valor nutricional de los ensilajes (Murdoch *et al.* 1955, Stewart 1967, Ely 1978, Lindgren *et al.* 1983, y Jones 1988, citados por McDonald *et al.* 1991). Por lo tanto, al adicionar el sorgo se pensó reducir la capacidad tampón en la mezcla y consecuentemente, incrementar la ensilabilidad.

Puesto que los CSA fueron bajos en la canavalia, la vigna y el sorgo, las mieles se adicionaron como fuente complementaria de los CSA. También, las bacterias ácido lácticas (BAL) como inoculantes se cree que mejoraron la fermentación del ensilaje (Zimmer 1990, Muck y Bolsen 1991, Spoelstra 1991 y Muck 1993).

El uso de las bacterias ácido lácticas mostró un claro impacto en la rapidez de la disminución del pH y del pH final a las 38 h en la PFR para la vigna (tabla 4). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas de pH a las 38 h entre todas las variantes cuando se usaron las bacterias ácido lácticas. Contrario a la vigna, la reducción del pH en la PFR de la canavalia estuvo menos influenciada por el uso de los aditivos (bacterias ácido lácticas y mieles). Sin embargo, en la alternativa con la canavalia + *Lactobacillus plantarum* + sorgo se observó un decrecimiento de pH más rápido (entre 0 y 22 h, tabla 5). El efecto combinado de *Lactobacillus plantarum* y el efecto disolvente del sorgo en la capacidad tampón se pudiera asociar a la rápida disminución del pH.

A medida que tiene lugar la fermentación en la PFR en una solución acuosa, los procesos bioquímicos ocurren de forma más rápida en el método *in vitro* comparado con los ensilajes. Por lo tanto, se espera que al tiempo de medición de las 38 h en la PFR, correspondiente a un ensilaje anaerobicamente estable, se completen los procesos de fermentación (Pieper *et al.* 1989, y Zierenberg 2000), lo que se demuestra por el menor pH a las 38 h en todos los tratamientos (tabla 6). Además de los efectos del tiempo de fermentación y el tratamiento en los valores de pH, se observaron también las interacciones de esos factores (tabla 6).

Aunque el contenido de los CSA en la vigna parecería demasiado bajo (tabla 3), se debe asumir que otras fuentes de CSA estaban disponibles en cantidades suficientes para garantizar una buena ensilabilidad. Los principales azúcares presentes en la fracción de los CSA de las leguminosas fueron la fructosa, la

Tabla 2. Composición química de granos de canavalia, vigna y sorgo usados en la Prueba de Fermentación de Rostock

Grano	MS (%)	PC (%MS)	FC (%MS)	FND (%MS)	FAD (%MS)	Almidón (%MS)	Ceniza (%MS)
Canavalia	84.2	33.4	9.0	24.9	16.5	35.9	3.3
Vigna	87.0	27.3	6.3	23.0	15.5	38.7	5.0
Sorgo	85.3	9.5	3.1	15.7	11.5	73.9	2.0

FAD – fibra ácido detergente; FC – fibra cruda; PC – proteína cruda; MS – materia seca; FND – fibra neutro detergente

Tabla 3. Contenido de carbohidratos soluble en agua (CSA), capacidad tampón (CT), y relación CSA/CT de los granos usados en la Prueba de Fermentación de Rostock.

Grano	CSA (g/100 g MS)	CT (g AL/100 g MS)	Relación CSA/CT
Canavalia	0.0	9.0	0.0
Vigna	2.3	6.3	0.4
Sorgo	0.2	3.1	0.1

CT – capacidad tampón; MS – material seca; AL – ácido láctico; CSA - carbohidratos solubles en agua

Tabla 4. Cinética de pH durante la incubación de granos de vigna solos o mezclados con granos de sorgo en la Prueba de Fermentación de Rostock.

	0 h	14 h	18 h	22 h	26 h	38 h
Vigna	6.37 ^a ± 0.00	5.77 ^c ± 0.06	5.80 ^d ± 0.07	5.57 ^d ± 0.09	5.31 ^c ± 0.13	5.50 ^c ± 0.06
Vigna + Mieles	6.40 ^b ± 0.04	5.84 ^c ± 0.05	5.77 ^d ± 0.05	5.22 ^c ± 0.02	5.00 ^b ± 0.06	4.99 ^b ± 0.10
Vigna + Sorgo	6.38 ^{ab} ± 0.00	5.79 ^c ± 0.04	5.59 ^c ± 0.04	5.04 ^b ± 0.06	4.92 ^b ± 0.17	4.95 ^b ± 0.25
Vigna + Bacterias ácido lácticas	6.36 ^a ± 0.00	5.18 ^a ± 0.06	4.45 ^a ± 0.06	4.29 ^a ± 0.03	4.18 ^a ± 0.02	4.02 ^a ± 0.02
Vigna + Bacterias ácido lácticas + Mieles	6.37 ^a ± 0.00	5.37 ^b ± 0.07	4.58 ^b ± 0.04	4.24 ^a ± 0.02	4.19 ^a ± 0.02	4.04 ^a ± 0.01
Vigna + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	6.35 ^a ± 0.00	5.18 ^a ± 0.04	4.46 ^a ± 0.04	4.24 ^a ± 0.01	4.10 ^a ± 0.01	3.99 ^a ± 0.01

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05).

Tabla 5. Cinética de pH durante la incubación de granos de canavalia solos o mezclados con granos de sorgo mediante la Prueba de Fermentación de Rostock.

	0 h	14 h	18 h	22 h	26 h	38 h
Canavalia	6.10 ^c ± 0.01	5.99 ^c ± 0.02	5.73 ^c ± 0.04	5.15 ^c ± 0.30	4.89 ^b ± 0.29	4.62 ^b ± 0.20
Canavalia + Mieles	6.14 ^c ± 0.00	6.02 ^c ± 0.01	5.73 ^c ± 0.22	5.10 ^{bc} ± 0.49	4.77 ^b ± 0.31	4.51 ^{ab} ± 0.25
Canavalia + Sorgo	6.13 ^d ± 0.00	5.91 ^b ± 0.04	5.55 ^{bc} ± 0.04	4.99 ^{bc} ± 0.07	4.58 ^{ab} ± 0.04	4.50 ^{ab} ± 0.04
Canavalia + Bacterias ácido lácticas	6.07 ^a ± 0.01	5.93 ^b ± 0.01	5.51 ^b ± 0.02	4.89 ^{abc} ± 0.05	4.63 ^{ab} ± 0.02	4.51 ^{ab} ± 0.02
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Mieles	6.09 ^b ± 0.00	5.92 ^b ± 0.03	5.43 ^b ± 0.08	4.65 ^{ab} ± 0.06	4.43 ^a ± 0.02	4.35 ^a ± 0.00
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	6.11 ^c ± 0.01	5.74 ^a ± 0.03	4.91 ^a ± 0.02	4.48 ^a ± 0.02	4.43 ^a ± 0.01	4.33 ^a ± 0.01

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05).

Tabla 6. Efecto del tiempo de fermentación y de los tratamientos en el pH de granos de canavalia y vigna en la Prueba de Fermentación de Rostock.

	pH	
	Vigna	Canavalia
Tiempo de fermentación (h)		
0	6.37 ^a	6.11 ^a
14	5.52 ^b	5.92 ^b
18	5.11 ^c	5.48 ^c
22	4.77 ^d	4.88 ^d
26	4.62 ^e	4.62 ^e
38	4.58 ^e	4.47 ^f
Tratamiento		
Leguminosa	5.72 ^a	5.41 ^a
Leguminosa + Mieles	5.54 ^b	5.38 ^a
Leguminosa + Sorgo	5.44 ^c	5.28 ^b
Leguminosa + Bacterias ácido lácticas	4.75 ^e	5.26 ^b
Leguminosa + Bacterias ácido lácticas + Mieles	4.80 ^d	5.15 ^c
Leguminosa + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	4.72 ^e	5.00 ^d
DE agrupada	0.07	0.14
Valores P		
Tiempo de fermentación	<0.001	<0.001
Tratamiento	<0.001	<0.001
Tiempo de fermentación *tratamiento	<0.001	0.002

^{abc} Medias con diferente superíndice en la misma columna se refieren a los modelos generales lineales (univariados)

glucosa y la sacarosa (Raguse y Smith 1966), aunque también se detectaron la rafinosa y la estaquiosa (Hirst *et al.* 1959). En un estudio de 9 variedades de vinya, los contenidos de rafinosa y estaquiosa fueron de 0.7 - 6.9 y de 2.4 - 3.9 %, respectivamente (Nwinuka *et al.* 1997). Akpapunam y Markakis (1979) evaluaron 13 variedades de vinya (*Vigna sinensis*) con contenidos promedio de 2.2 % sacarosa, 1.2 % rafinosa, 3.4 % estaquiosa y 0.9 % verbascosa (todos azúcares en base de MS). Por lo tanto, es posible que la vinya usada en este estudio tuviera contenidos razonables de oligosacáridos, lo que deberá ser probado en futuras investigaciones. Las variantes de la PFR con adición de *Lactobacillus plantarum* mostraron contenidos significativamente mayores de lactato y menores de ácidos grasos volátiles si se comparan con aquellos tratamientos sin inoculante. Por el contrario, en la vinya + *Lactobacillus plantarum* + sorgo la producción de lactato fue menor (4.34 % MS) comparada con la vinya + *Lactobacillus plantarum* y la vinya + *Lactobacillus plantarum* + mieles (6.83 y 6.85 % MS, respectivamente; tabla 7).

Cuando se adicionó maíz molido (54.5 kg/t) a una mezcla de alfalfa y pasto bromo, se detectó un incremento en la MS del ensilaje así como del contenido total de ácido y de ácido láctico (Allen y Porter 1954, citados por McDonald *et al.* 1991). Como la suplementación de sorgo no mostró un efecto similar, se puede asumir que el contenido de taninos condensados en la variante de sorgo utilizada (CIAP-

2E) pudo haber restringido el desarrollo de las bacterias ácido lácticas. Además, se conoce que el carbohidrato fundamental en los cereales es el almidón (73.9 % en los granos de sorgo usados en este estudio), un polisacárido no disponible para la mayoría de las bacterias ácido lácticas (McDonald y Whittenbury 1973). En cambio, Gefrom *et al.* (2009) informaron contenidos reducidos de almidón en ensilajes de granos de lupino con elevada humedad. Por lo tanto, se estima que el almidón podría probablemente usarse por otros microorganismos que degradan almidón que interactúan con las bacterias ácido lácticas aplicadas después del ensilaje. Además, podría ser posible una actividad incrementada de las enzimas endógenas de los granos (Pieper *et al.* 2010). Como consecuencia, se pudiera sugerir que el sorgo no se debe usar como la única fuente de CSA en esos ensilajes.

Aunque los niveles de alcoholes y NH₃ (tabla 8) fueron marginales en todas las variantes de la PFR, la vinya + *Lactobacillus plantarum* y la vinya + *Lactobacillus plantarum* + mieles mostraron los menores contenidos si se comparan con los otros tratamientos. Cuando solo se agregó sorgo a la vinya, se detectó menos alcohol y NH₃, pero solo en las variantes sin *Lactobacillus plantarum*. Cuando se usó *Lactobacillus plantarum*, no se observó este efecto. Presumiblemente, la acción de los taninos en los granos de sorgo pudiera ser la razón. Salawu *et al.* (1999) informaron un hallazgo similar en ensilajes de laboratorio a pequeña escala al utilizar taninos de

Tabla 7. Contenidos de lactato y ácidos grasos volátiles (% MS) en filtrados de la Prueba de Fermentación de Rostock con granos de vinya después de 38 h de incubación

	Lactato	Acetato	Propionato	Butirato
Vinya	0.00 ^a ± 0.00	1.76 ^d ± 0.00	ND	1.64 ^a ± 0.16
Vinya + Mieles	2.40 ^b ± 0.41	1.41 ^c ± 0.11	ND	1.20 ^b ± 0.30
Vinya + Sorgo	0.22 ^a ± 0.12	1.04 ^b ± 0.01	ND	1.85 ^a ± 0.16
Vinya + Bacterias ácido lácticas	6.83 ^d ± 0.04	0.67 ^a ± 0.00	ND	ND
Vinya + Bacterias ácido lácticas + Mieles	6.85 ^d ± 0.14	0.62 ^a ± 0.05	ND	ND
Vinya + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	4.34 ^c ± 0.04	0.62 ^a ± 0.01	ND	ND

^{abcd}Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05). ND No detectado

diferentes fuentes para ensilar ryegrass perenne. Ellos informaron un efecto de la suplementación de los taninos, lo que condujo a una rápida acidificación y a la protección de la proteína mediante el enlace con los taninos. Además, Grabber *et al.* (2002) notificaron el efecto de los taninos en el enlace de proteínas en los ensilajes al usar dos variedades de alfalfa (con o sin taninos), lo que disminuyó en consecuencia la formación de NH₃.

La adición de *Lactobacillus plantarum* sola o en combinación con las mieles produjo la mayor producción de lactato en la canavalia (tabla 9). La producción de ácido butírico fue en

general mínima para todas las variantes. La fermentación de ácido acético ocurrió también durante la PFR, y se detectó el menor valor en canavalia + *Lactobacillus plantarum* + mieles (0.45 % MS), que fue la alternativa con el menor contenido de ácidos grasos volátiles en general y el de mayor contenido de lactato (4.63 % MS), lo que sugiere buenas características de ensilabilidad de este tratamiento.

La producción de alcoholes en canavalia fue menor en la mayoría de las variantes si se comparan con la vinya (tabla 10). Sin embargo, la canavalia y la canavalia + mieles tuvieron niveles mayores si se comparan con

Tabla 8. Contenidos de alcohol (% MS) y NH₃ (% MS) en filtrados de la Prueba de Fermentación de Rostock con granos de vigna después de 38 h de incubación.

	Etanol	Propanol	2,3 Butanediol	NH ₃
Vigna	1.53 ^e ± 0.19	ND	2.08 ^d ± 0.59	0.30 ^e ± 0.03
Vigna + Mieles	0.99 ^d ± 0.00	ND	1.68 ^c ± 0.16	0.24 ^d ± 0.01
Vigna + Sorgo	0.52 ^c ± 0.06	ND	0.83 ^b ± 0.12	0.14 ^c ± 0.01
Vigna + Bacterias ácido lácticas	0.16 ^a ± 0.00	ND	0.05 ^a ± 0.00	0.07 ^a ± 0.00
Vigna + Bacterias ácido lácticas + Mieles	0.15 ^a ± 0.00	ND	0.07 ^a ± 0.02	0.08 ^a ± 0.01
Vigna + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	0.30 ^b ± 0.01	ND	0.05 ^a ± 0.02	0.10 ^b ± 0.00

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05). ND-No detectado

los otros tratamientos. Como en la vigna, la inclusión de sorgo se asoció con los menores niveles de NH₃, mientras que la canavalia + *Lactobacillus plantarum* + sorgo mostró las menores cantidades (0.06 % MS), lo que representó una reducción de 55 % con respecto al control. Tabacco *et al.* (2006) alcanzaron 15 % de reducción comparado con el control cuando se agregó 4 % de taninos de castaña (hidrolizable) en silos de alfalfa

a escala de laboratorio. Las condiciones experimentales diferentes (diferentes fuentes de taninos) y materiales vegetales pudieran ser la razón de tal diferencia.

Los resultados revelaron que la PFR es una herramienta apropiada para predecir la ensilabilidad en un corto período de tiempo, mientras que requiere de pocas facilidades en el laboratorio. En este estudio se concluyó que, al final de la PFR (38 h), se obtuvieron

Tabla 9. Contenidos de lactato y ácidos grasos volátiles (% MS) en filtrados de la Prueba de Fermentación de Rostock con granos de canavalia después de 38 h de incubación

	Lactato	Acetato	Propionato	Butirato
Canavalia	2.26 ^a ± 0.24	1.14 ^{bc} ± 0.26	ND	0.05 ± 0.04
Canavalia + Mieles	2.80 ^c ± 0.00	1.28 ^c ± 0.06	ND	ND
Canavalia + Sorgo	2.23 ^a ± 0.03	0.83 ^b ± 0.03	ND	0.05 ± 0.01
Canavalia + Bacterias ácido lácticas	3.71 ^d ± 0.06	0.93 ^b ± 0.09	ND	ND
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Mieles	4.63 ^e ± 0.07	0.45 ^a ± 0.36	ND	ND
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	2.51 ^b ± 0.01	0.84 ^b ± 0.00	ND	ND

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05). ND-No detectado

Tabla 10. Contenidos de alcohol (% MS) y NH₃ (% MS) en filtrados de la Prueba de Fermentación de Rostock con granos de canavalia después de 38 h de incubación

	Etanol	Propanol	2,3 Butandiol	NH ₃
Canavalia	0.34 ^b ± 0.04	ND	0.11 ^{ab} ± 0.03	0.11 ^e ± 0.01
Canavalia + Mieles	0.36 ^b ± 0.04	ND	0.23 ^b ± 0.12	0.12 ^f ± 0.01
Canavalia + Sorgo	0.19 ^a ± 0.03	ND	0.14 ^{ab} ± 0.05	0.07 ^b ± 0.01
Canavalia + Bacterias ácido lácticas	0.18 ^a ± 0.07	ND	ND	0.09 ^d ± 0.00
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Mieles	0.15 ^a ± 0.00	ND	0.03 ^a ± 0.00	0.09 ^d ± 0.00
Canavalia + Bacterias ácido lácticas + Sorgo	0.19 ^a ± 0.02	ND	0.03 ^a ± 0.00	0.06 ^a ± 0.00

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05). ND-No detectado

buenas características de fermentación y bajos valores de pH en los granos de vigna y canavalia, solos o mezclados con granos de sorgo. Sin embargo, se debe considerar el uso de inoculantes solos o en combinación con mieles. Se recomiendan futuros estudios con ensilajes modelo a escala de laboratorio para investigar el efecto del sorgo en la reducción de NH_3 , como se mostró en la PFR de la vigna y la canavalia.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo del personal técnico de la oficina de fisiología nutritiva y de nutrición animal de la Universidad de Rostock por los análisis químicos y la ayuda de los trabajadores de la Estación Experimental “Álvaro Barba” de la Universidad de “Las Villas” por el establecimiento y cosecha de las parcelas experimentales.

Referencias

- Akpanunam, M.A. & Markakis, P. 1979. Oligosaccharides of 13 American cultivars of cowpeas (*Vigna sinensis*). J. Food Sci. 44:1317
- Amubode, F.O. & Fetuga, B.L. 1983. Proximate composition and chemical assay of the methionine, lysine and tryptophan concentration of some forest tree seeds. Food Chem. 12:67
- Belmar, R., Nava-Montero, R., Sandoval-Castro, C. & McNab, J.M. 1999. Jack bean (*Canavalia ensiformis* L. DC) in poultry diets: antinutritional factors and detoxification studies – a review. World's Poultry Science Journal, Vol. 55
- Bhat, R., Sridhar, K.R., Young, C.C., Arun, A.B. & Ganesh, S. 2008. Composition and functional properties of raw and electron beam-irradiated *Mucuna pruriens* seeds. Int. J. Food Sci. Technol. 43:1338
- Cáceres, O., González, E. & Delgado, R. 1995. *Canavalia ensiformis*: leguminosa forrajera promisorio para la agricultura tropical. Pastos y Porrajes, 18:2
- Cherney, J.H. & Cherney, D.J.R. 2003. Assessing silage quality, En: Silage Science and Technology, ed. by Buxton DR, Muck RE and Harrison JH. American Society of Agronomy, Madison, WI
- Deshpande, S.S. & Salunkhe, D.K. 2000. Grain legumes, seeds and nuts: rationale for fermentation. Fermented Grain Legumes, Seeds and Nuts: A Global Perspective. FAO Agricultural Services Bulletin, FAO, Rome, 142:1-32
- Ekanayake, S., Jansz, E.R. & Nair, B.M. 2000. Literature review of an underutilized legume: *Canavalia gladiata* L. Plant foods for human nutrition 55:305
- Ensminger, M.E. 1992. The Stockman's Handbook. Seventh edition by Interstate Publishers. U.S.A.
- Gefrom, A., Ott, E.M. & Zeyner, A. 2009. Ensiling moistly harvested lupine seeds and the influence of conservation on oligosaccharides. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 18:115
- Goering, H.K. & van Soest, P.J. 1970. Forage fibre analysis. ARS, USDA, Washington, DC
- Gómez-Brenes, R., Bendana, G., Gonzalez, J.M., Jarquin, R., Braham, J.E. & Bressani, R. 1988. Effects of the treatment of coffee pulp, fresh or ensilaged, with calcium hydroxide, on its nutritive value. Arch. Latinoam. Nutr. 38:173
- Grabber, J., Rotz, C. & Muck, R. 2002. Tannin-containing alfalfa: a way to improve nitrogen-use and profitability of dairy farms? Abstract. American Grassland Council Conference Proceedings. 17 July 2002. Disponible: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=134825
- Hirst, E.L., Mackenzie, D.J. & Wylam, C.B. 1959. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. J. Sci. Food Agric. 10:19
- Hoedtke, S. & Zeyner, A. 2011. Comparative evaluation of laboratory-scale silages using standard glass jar silages or vacuum-packed model silages. J. Sci. Food Agric. 91:841
- Kjeldahl, J. 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Fresenius J. Anal. Chem. 22:366
- Liener, I.E. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Am. J. Clin. Nutr. Vol 11
- McDonald, P. & Henderson, A.R. 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. J. Sci. Food Agric. 13:395
- McDonald, P., Henderson, N. & Heron, S. 1991. The biochemistry of silage. Chalcombe Publications, Marlow, UK
- McDonald, P. & Whittenbury, R. 1973. Chemistry and biochemistry of herbages, (Butler, G.W. and Bailey, R.W., Eds.) Academic Press, New York. 3:33
- Menge-Hartmann, U., Soufan, W. & Greef, J.M. 2009. The influence of plant development stage and N fertilization on the content of watersoluble carbohydrates and fructans in different varieties of *Lolium perenne*. J. Kulturpflanzen 61:365
- Muck, R.E. 1993. The role of silage additives in making high quality silages. Proceedings of the National Silage Producers Conference. NREAS-67, Ithaca, NY, 106
- Muck, R.E. & Bolsen, K.K. 1991. Silage preservation and silage additive. En: Hay and silage management in North America (Bolsen, K.K., Baylor, J.E., McCullough, eds). National Feeds Ingredients Association, West Des Moines, Iowa, 105
- Nwinuka, N.M., Abbey, B.W. & Ayalogu, E.O. 1997. Effect of processing on flatus producing oligosaccharides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and the tropical African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). Plant Foods Hum. Nutr. 51:209
- Pieper, R., Hackl, W., Korn, U., Zeyner, A., Souffrant, W.B., Pieper, B. 2010. Effect of ensiling triticale, barley and wheat grains at different moisture content and addition of *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 8866 and 8862) on fermentation characteristics and nutrient digestibility in pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 164:96
- Pieper, B., Kleemann, J., Poppe, S., Allert, H., Losch, K., Wittchen, H., Mielitz, E. & Schulz, A. 1989. Verfahren zur Bestimmung der Vergärbarkeit von Futterpflanzen. Patent specification DD 281 255 A5. Patent office of the GDR
- Raguse, C.A. & Smith, D. 1966. Some nonstructural carbohydrates in forage legume herbage. J. Agric. Food Chem. 14:423
- Salawu, M.B., Acamovic, T., Stewart, C.S., Hvelplund, T. & Weisbjerg, M.R. 1999. The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. Anim. Feed Sci. Technol. 82:243
- Schmidt, T., Krawielitzki, K., Voigt, J. & Gabel, M. 2005.

- Methodical aspects of the *in situ* technique for estimating ruminal nutrient degradation: microbial contamination and lag time. Übers. Tierernährg. 33:87
- Sotelo A, Migliaro P, Toledo A & Contreras J. 1999. Chemical composition, digestibility and antinutritional factors content of two wild legumes: *Styphonolobium burseroides* and *Acacia bilimekii*. Plant Foods Hum. Nutr. 54:59
- Spoelstra, S.F. 1991. Chemical and biological additives in forage conservation. En: Forage Conservation Towards 2000 (Pahlow, G., Honig, H., eds). Institute of Grassland Forage Research, Braunschweig, Germany, 40
- SPSS, 2010. Software for Windows, version 19, Inc., Chicago, IL, USA
- Sridhar, K.R. & Seená, S. 2006 Nutritional and anti-nutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. Food Chem. 99:267
- Tabacco, E., Borreani, G., Crovetto, G.M., Galassi, G., Colombo D. & Cavallarin L. 2006. Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. J. Dairy Sci. 89:4736
- Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA, Ed.) 1993. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. In: Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 46, Número 1, 2012. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Vol. III. VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- Voigt, J. & Steger, H. 1967. Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff und Ketokörpern in biologischem Material mit Hilfe eines modifizierten Mikrodifusionsgefäßes. Archiv Tierernähr. 17:289
- Weißbach, F. 1967. Die Bestimmung der Pufferkapazität der Futterpflanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Vergärbarkeit. Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR 92:211
- Wilson, R.F. & Wilkins, R.J. 1972. An evaluation of laboratory ensiling techniques. J. Sci. Food Agric. 23:377
- Zierenberg, B. 2000. *In vitro* Methode zur Beurteilung der Fermentationsleistung von Milchsäurebakterien und deren Einfluss auf die Stoffwechselaktivität weiterer für die Silierung relevanter Mikroorganismen bei unterschiedlichen Fermentationsbedingungen. PhD thesis, University of Rostock
- Zimmer, E. 1990. Evaluation of fermentation parameters from the silages experiments. En: Proceedings of the EUROBAC Conference (S. Lindgren and K.L. Pettersson, eds). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 19

Recibido: 26 de mayo de 2011