

## ***In vitro* degradability kinetics of Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) silage with different levels of inclusion and concentration of sugar cane (*Saccharum officinarum*) vinasse<sup>st</sup>**

### *Cinética de la degradabilidad in vitro de ensilajes de Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña (*Saccharum officinarum*)*

### *Cinética da degradabilidade in vitro de ensilagem de Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) com diferentes níveis de inclusão e concentração de vinhaça de canha (*Saccharum officinarum*)*

Sergio Andrés Vargas Naranjo<sup>1\*</sup>, Zoot, Msc; Ricardo Rosero Noguera<sup>2</sup>, Zoot, Msc, PhD; Rolando Barahona Rosales<sup>1</sup>, Zoot, Msc, PhD

\*Autor para correspondencia: Sergio Andrés Vargas Naranjo. Universidad Nacional de Colombia. Correo electrónico: svargas@unal.edu.co.

<sup>1</sup> Grupo BIOGEM, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia; <sup>2</sup> Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA), Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Producción Agropecuaria, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido: 16 de abril, 2014; aceptado: 6 de junio, 2015)

#### **Abstract**

The use of additives promote changes in the chemical and structural characteristics of fodders during the silage process. Recent studies have shown that sugar cane vinasse can be utilized as an additive and serve as an important source of substrates which facilitate hydrolysis of the structural components of plant cell wall, increasing DM degradability. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* kinetics of Maralfalfa silage degradability under different levels of inclusion (3, 6, and 9% per kg/FV) and concentration (20, 30, and 40% DM, respectively) of sugar cane vinasse. The DM degradability was determined by the *in vitro* gas production technique. Data were analyzed using a completely randomized design in a 3 x 3 + 1 factorial arrangement with 5 repetitions. Vinasse inclusion increased *in vitro* DM degradability compared to the control (59.1 vs. 51.8% after 72 h, respectively; p<0.05). Furthermore, vinasse increased the soluble fraction (A; 14.62% versus 3.68%) and the effective degradability (48.4 versus 47.4%), respectively (p<0.05). We conclude that cane vinasse enhances the *in vitro* degradability and the nutritional value of silage made from raw materials of low nutritional quality.

<sup>st</sup>Para citar este artículo: Vargas Naranjo SA, Rosero Noguera R, Barahona Rosales R. Cinética de la degradabilidad *in vitro* de ensilajes de Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña (*Saccharum officinarum*). Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (2): 82-94.

## Key words

*Chemical composition, effective degradability, gas production, tropical forages.*

## Resumen

El uso de aditivos promueve cambios en las características químicas y estructurales del forraje durante el periodo de ensilado. Recientes estudios han mostrado que la vinaza de caña puede aprovecharse como aditivo y servir como una fuente importante de sustratos que faciliten la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular vegetal, aumentando la degradabilidad de la MS. El objetivo del presente estudio fue evaluar la cinética de la degradabilidad *in vitro* del ensilaje de Maralfalfa elaborado con diferentes niveles de inclusión (3%, 6% y 9% por kg/FV) y concentración (20%, 30% y 40% de MS, respectivamente) de vinaza de caña. La degradabilidad de la MS, se determinó mediante la técnica *in vitro* de producción de gases. Los datos fueron analizados utilizando un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 3 x 3 + 1 con 5 repeticiones. La inclusión de vinaza aumentó la degradabilidad *in vitro* de la MS con respecto al control (59,1% versus 51,8% a las 72 h, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Asimismo, con la inclusión de vinaza se aumentó la fracción soluble (A; 14,62% versus 3,68%) y la degradabilidad efectiva (48,4% versus 47,4%) con respecto al control, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Se concluye que la vinaza de caña es un aditivo que mejora la degradabilidad *in vitro* y el valor nutricional de ensilajes elaborados a partir de materias primas de baja calidad nutricional.

## Palabras clave

*Composición química, degradabilidad efectiva, forrajes tropicales, producción de gases.*

## Resumo

O uso de aditivos promove mudanças nas características químicas e estruturais da forragem durante o período de ensilagem. Recentes estudos têm mostrado que a vinhaça de canha pode ser aproveitada como aditivo e server como uma fonte importante de substratos que facilitem a hidrólise dos componentes estruturais da parede celular vegetal, aumentando a degradabilidade da matéria seca (MS). O objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética da degradabilidade *in vitro* da ensilagem de Maralfalfa elaborado com diferentes níveis de inclusão (3%, 6% e 9% por kg/FV) e concentração (20%, 30% e 40% de MS, respectivamente) de vinhaça de canha. A degradabilidade da MS, determinou-se mediante a técnica *in vitro* de produção de gases. Os dados foram analisados utilizando um desenho inteiramente ao acaso em um desenho fatorial 3 x 3 + 1 com 5 repetições. A inclusão da vinhaça aumentou a degradabilidade *in vitro* da MS comparada com o controle (59,1% versus 51,8% às 72 h, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Do mesmo jeito, com a inclusão da vinhaça aumentou-se a fração solúvel (A; 14,62% versus 3,68%) e a degradabilidade efetiva (48,4% versus 47,4%) com respeito ao controle, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que a vinhaça de canha é um aditivo que melhora a degradabilidade *in vitro* e o valor nutricional de ensilagem elaborado a partir de matérias primas de baixa qualidade nutricional.

## Palavras-chave:

*Composição química, degradabilidade efetiva, forragens tropicais produção de gases.*

## Introducción

El ensilaje permite conservar los alimentos y garantizar una oferta de materia seca adecuada durante las épocas de escasez <sup>21</sup>, las cuales son de gran importancia en el trópico y reducen la productividad tanto de las praderas como de los animales <sup>12</sup>. El ensilado resulta de la

generación de acidez a partir del catabolismo de sustratos como carbohidratos solubles, proteínas y aminoácidos presentes en el forraje, bajo condiciones de anaerobiosis. Este proceso conlleva cambios sobre la calidad nutricional, composición química y la degradabilidad

del material ensilado <sup>23</sup>. Una inadecuada preservación del forraje conlleva pérdidas de materia seca (MS) del material vegetal, bajo consumo del ensilaje y pobre utilización de los nutrientes por parte del animal <sup>38</sup>.

La utilización de aditivos previo al ensilado representa una estrategia para optimizar la conservación del forraje, los procesos fermentativos y la reducción en la producción de efluentes <sup>16, 23, 40</sup>. Se ha reportado que la adición de aditivos como melaza a ensilajes de gramíneas mejora los procesos fermentativos <sup>9, 10</sup> y la digestibilidad de la MS <sup>20</sup>.

La vinaza es un subproducto derivado de la fermentación anaeróbica de la melaza y se caracteriza por su bajo pH (4,2-4,6), alto contenido de materia orgánica en suspensión y una cantidad apreciable de sales inorgánicas compuestas de sulfatos y fosfatos de calcio, potasio, sodio y magnesio <sup>14</sup>. Aunque ha sido considerada como un producto indeseable pues su inadecuada disposición ha sido relacionada con la eutrofización de ríos y mares, la vinaza también puede aprovecharse como un aditivo acidificante en la elaboración de ensilajes <sup>17, 18, 30</sup>. Efectos positivos del uso de vinaza en dietas para rumiantes incluyen mayor palatabilidad, mayor ganancia de peso y conversión alimenticia en bovinos de ceba <sup>28</sup>. Otros autores han reportado mayor degradabilidad ruminal *in situ* en ovejas canuladas, causado por la adición de 130 g/kg de vinaza en la dieta <sup>13</sup>. Otros estudios han mostrado que dada la alta digestibilidad de la vinaza

(>70%) este subproducto puede ser utilizado en pequeñas proporciones en dietas para vacunos y cerdos <sup>35</sup>.

Existe poca información científica y estudios sobre el valor de la vinaza como aditivo acidificante en la producción de ensilajes y su efecto sobre el proceso fermentativo. Sin embargo, la utilización de ácidos orgánicos como el ácido acético y láctico son frecuentemente incorporados durante el ensilaje con resultados positivos en la fermentación y conservación del forraje<sup>8</sup>. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la cinética de la degradabilidad *in vitro* de ensilajes de Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión (3, 6 y 9%, por kg/FV) y concentración (20, 30 y 40%, respectivamente) de vinaza de caña de azúcar.

## Materiales y métodos

### Cosecha del forraje y ensilado

El estudio se realizó en la hacienda “El Progreso” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, localizada en una zona de vida bosque húmedo premontano (bh-PM)<sup>15</sup>. Para la confección de los ensilajes se utilizó pasto Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) cosechado a 60 días de edad y picado a 2 cm de tamaño, obteniéndose varias muestras de pasto (*Pennisetum sp.*) fresco para la determinación de su composición bromatológica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición química del pasto Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) y de la vinaza de caña de azúcar.

<i>Nutriente</i>	<i>Pasto</i>	<i>Vinaza</i>	<i>Método</i>
Materia seca	15,0	78,0	Secado en estufa de ventilación forzada a 64 °C por 72 horas (934.012)
Proteína cruda	7,3	7,5	Método Kjeldahl (984.13 <sup>2</sup> )
FDN	66,00	----	Método Van Soest <sup>38</sup>
FDA	33,6	----	Método Van Soest <sup>38</sup>
Hemicelulosa	31,00	----	Diferencia entre FDN y FDA
NIDA	0,32	----	Método Kjeldahl (984.13 <sup>2</sup> )
Cenizas	8,00	7,00	Incineración a 550 °C <sup>1</sup>
pH	----	4,30	Medición por pHmetro Shott portátil modelo pH11

Fuente: Laboratorio Nutrilab-UdeA. FDN: Fibra en Detergente Neutro, FDA: Fibra en Detergente Ácido, NIDA: Nitrógeno Insoluble en Detergente Ácido.

La vinaza de caña fue concentrada hasta alcanzar 78% de MS y su composición se muestra en la Tabla 1. Para el proceso de ensilaje, se utilizaron 50 silos de laboratorio confeccionados con tubos de "PVC" de 10 cm de diámetro y 40 cm de largo, con capacidad de 2 kg de forraje verde (FV), de acuerdo al procedimiento descrito por Pereira *et al.*<sup>29</sup>. El forraje picado fue mezclado con la vinaza de caña mediante aspersión manual, de acuerdo al tratamiento asignado. El material vegetal fue almacenado y compactado en silos experimentales para garantizar adecuadas condiciones de anaerobiosis y fermentación.

#### Tratamientos

Se evaluaron 10 tratamientos, resultantes de combinar tres niveles de inclusión (3%, 6% y 9%) de vinaza con tres concentraciones de MS (20%, 30% y 40%) más un testigo, con cinco repeticiones. Los tratamientos se describen a continuación:

Testigo: Maralfalfa + 0% de vinaza  
 I3C20: Maralfalfa + 3% de vinaza al 20%  
 I3C30: Maralfalfa + 3% de vinaza al 30%  
 I3C40: Maralfalfa + 3% de vinaza al 40%

I6C20: Maralfalfa + 6% de vinaza al 20%  
 I6C30: Maralfalfa + 6% de vinaza al 30%  
 I6C40: Maralfalfa + 6% de vinaza al 40%  
 I9C20: Maralfalfa + 9% de vinaza al 20%  
 I9C30: Maralfalfa + 9% de vinaza al 30%  
 I9C40: Maralfalfa + 9% de vinaza al 40%

#### Apertura de los silos

Los silos fueron abiertos después de 30 días de fermentación y cada uno fue retirado, homogenizado y pesado para determinar el contenido de MS por secado de la muestra en estufa de ventilación forzada a 64 °C por 72 horas (934,01<sup>2</sup>), proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl (984,13<sup>2</sup>) y cenizas por incineración a 550° C durante 4 horas, de acuerdo con el procedimiento descrito por la AOAC<sup>1</sup>, fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) por el método Van Soest<sup>39</sup>, la hemicelulosa por diferencia entre FDN y FDA, y el nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDA), determinando del contenido de nitrógeno en el residuo de FDA por el método de Kjeldahl (984.13<sup>2</sup>). En la tabla 2 se muestra la composición química de los ensilajes con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza.

**Tabla 2.** Composición química del ensilaje de Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña (*Saccharum officinarum*).

Tratamientos	MS	PC	NIDA	FDN	FDA	HEMI	CEN
Control	14,9	6,48	0,27	62,9	34,1	28,8	7,67
I3C20	14,7	7,07	0,18	60,1	33,5	26,6	8,48
I3C30	15,9	7,22	0,28	55,9	32,4	23,6	8,97
I3C40	14,6	6,89	0,33	57,0	30,7	26,3	10,31
I6C20	14,5	6,23	0,30	60,7	35,8	24,9	11,71
I6C30	16,6	6,70	0,31	60,5	33,0	28,1	10,04
I6C40	15,9	6,31	0,26	58,7	32,7	26,0	12,10
I9C20	20,1	7,77	0,37	47,7	24,1	23,6	10,36
I9C30	20,6	7,92	0,31	45,1	23,5	21,6	10,98
I9C40	20,9	8,18	0,29	46,5	23,1	23,5	10,17

Abreviaturas = MS: materia seca; PC: proteína cruda; NIDA: nitrógeno insoluble en detergente ácido; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; HEMI: hemicelulosa; CEN: cenizas.

## Degradabilidad *in vitro*

La cinética de la degradabilidad *in vitro* de MS (DIVMS) de los ensilajes, fue determinada mediante la técnica *in vitro* de producción de gases descrita por Theodorou *et al.*<sup>36</sup>. Se usó una solución tampón con 9,80 gr/L de NaHCO<sub>3</sub>, 4,65 gr/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,57 de KCl, 0,47 gr/L de NaCl, 0,12 gr/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0,05 gr/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>33</sup>. Se agitó para garantizar una mezcla uniforme del medio, para luego saturarlo con CO<sub>2</sub> por dos horas e incubarlo en una estufa de ventilación forzada a 39 °C.

Se recolectó inóculo ruminal de forma manual de una vaca de la raza Holstein con cánula ruminal permanente y se almacenó en garrafas térmicas previamente calentadas con agua a 39 °C. Este inóculo fue trasladado al laboratorio y filtrado a través de paños de algodón, transfiriendo la parte líquida a un Erlenmeyer que se mantuvo a 39 °C y que fue saturado continuamente con CO<sub>2</sub> para garantizar anaerobiosis. Se utilizaron frascos de vidrio de 100 ml, los cuales fueron servidos con 5 ml de líquido ruminal, 45 ml de solución tampón y 0,5 gramos de ensilaje correspondientes al tratamiento asignado. Los frascos fueron sellados con un tapón de caucho, se agitaron moderadamente y se llevaron a incubación en estufa de ventilación forzada a 39 °C.

La presión generada por la acumulación de gases durante la fermentación se midió mediante un transductor digital de presión tipo OMEGA, Modelo PX 605-030GI. La materia seca degradada fue determinada por diferencia entre el peso inicial y el peso del residuo a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-incubación. Para transformar los datos de presión en volumen, se usó la ecuación  $Y = -0,1375 + 5,1385X + 0,0777X^2$ , donde Y representa el volumen de gas producido por cada unidad de presión (X)<sup>31</sup>.

## Análisis estadístico

Para comparar el efecto de la inclusión y concentración de vinaza sobre la degradabilidad *in vitro* de la MS de los ensilajes, se utilizó un arreglo factorial 3 x 3 + 1 (tres niveles de inclusión por tres niveles de concentración más un control), con 5 repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico planteado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + C_j + (V * C)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$ : variable respuesta efecto del k-ésimo variable, en el i-ésimo nivel de inclusión, con la j-ésima concentración.  
 $\mu$ : Media general

$V_i$ : Efecto del i-ésimo nivel de inclusión de la vinaza

$C_j$ : Efecto de la j-ésima concentración de vinaza

$(V_i * C_j)_k$ : Efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel de inclusión y la j-ésima concentración de vinaza.

$E_{ijk}$ : Error experimental.

Los efectos simples y su interacción fueron analizados con el procedimiento PROC GLM. La comparación de medias se realizó por medio de la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Se utilizaron contrastes ortogonales para comparar las medias de los tratamientos que contenían vinaza con el tratamiento control, utilizando el procedimiento PROC GLM y las instrucciones CONTRAST y ESTIMATE<sup>19</sup>. Se realizó un análisis de correlación entre la DIVMS, el aporte de MS de la vinaza y los componentes fibrosos de los ensilajes a través de los procedimientos PROC GLM y PROC CORR.

Para describir la cinética de degradación de la MS se utilizó el modelo matemático<sup>22</sup>:

$$Y = A + B (1 - e^{-kd(t - \text{Lag})})$$

Dónde:

Y= degradación de la MS en el tiempo t

A= Fracción soluble

B= Fracción potencialmente degradable

Kd= Tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable

Lag= Tiempo lag, tiempo de colonización o duración del periodo pre-fermentativo

La estimación de los parámetros fue realizada a través del proceso iterativo del algoritmo de Marquardt con ayuda del procedimiento para modelos no lineales PROC NLIN. Adicionalmente, se calculó la fracción potencialmente



degradable (A+B) y la fracción indigestible (100-(A+B)). Para la determinación de la degradabilidad efectiva se empleó la expresión propuesta por Ørskov y McDonald<sup>27</sup>:

$$DE = A + ((B * c) / (c + k))$$

Dónde:

DE= degradabilidad efectiva de la MS

A= Fracción soluble y completamente degradable

B= Fracción insoluble pero potencialmente degradable.

c= Tasa de degradación de la fracción “B”.

k= Tasa fraccional de pasaje ruminal. Se asumió un valor de k = 0,02.

La cinética de degradación fue analizada mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo, haciendo uso del procedimiento PROC MIXED para la evaluación de las diferentes estructuras de covarianza, seleccionando la que presentara menor criterio de información de Akaike<sup>11</sup>.

## Resultados

### Degradabilidad *in vitro* de la MS en el tiempo

La degradabilidad *in vitro* de la MS del ensilaje de Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión y concentración es descrita en la Tabla 3 y 4. Después de 6 horas de incubación, los tratamientos que incluyeron vinaza demostraron mayor degradabilidad con respecto al control (p<0,05). A las 12, 24 y 48 horas, la degradabilidad de los tratamientos I9C30 e I9C40 fue significativamente mayor que la de los tratamientos I6C30 e I6C40 (Tabla 3). A las 72 horas de incubación, la degradabilidad *in vitro* de la MS incrementó significativamente por la adición de 9% de vinaza respecto a los niveles 3 y 6% (p<0,05, Tabla 4). La determinación de la degradabilidad se realiza por gravimetría, errores asociados al pesaje podrían estar asociados con la ausencia de una respuesta lineal en la degradación conforme se incrementaron los niveles de inclusión de vinaza. A las 72 horas no hubo diferencias estadísticas entre los ensilajes tratados con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto de la interacción nivel de inclusión x concentración de vinaza sobre la degradabilidad *in vitro* de la MS del ensilaje de pasto Maralfalfa.

	INCLUSIÓN POR CONCENTRACIÓN									
	I3C20	I3C30	I3C40	I6C20	I6C30	I6C40	I9C20	I9C30	I9C40	SEM
6 h	20,19	21,31	17,59	26,66	14,56	11,82	23,39	28,31	31,65	6,50
12 h	35,00	35,80AB	34,90 <sup>a</sup>	26,40	24,80B	19,20B	34,90	45,50A	38,50A	7,96
24 h	46,80	49,20AB	49,70 <sup>a</sup>	43,40	44,30B	41,30B	53,00	56,60A	48,10A	4,80
48 h	55,40	57,80B	55,00A	47,50	50,80B	46,50B	60,40b	65,20aA	63,10abA	7,77
72 h	58,73	58,80	56,31	55,39	58,33	51,25	65,55	68,52	64,21	5,45

Medias diferentes (p<0,05) dentro de un mismo nivel de inclusión, se presentan en letra minúscula. Letra mayúscula, las medias son diferentes (p<0,05) dentro de un mismo nivel de concentración con diferente nivel de inclusión (p<0,05). SEM: Error estándar de la media, I: nivel de inclusión, C: concentración.

**Tabla 4.** Degradabilidad *in vitro* de la MS del ensilaje de Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña en diferentes horas de incubación.

	INCLUSIÓN					CONCENTRACIÓN					Control vs. vinaza		
	0%	3%	6%	9%	SEM	20%	30%	40%	SEM	I		C	I x C
6 h	22,03	19,69	17,68	24,92	3,74	23,41	21,76	17,12	3,26	0,21	0,41	0,46	0,84
12 h	22,70	35,20a	23,48b	39,63a	8,34	32,10	35,37	30,84	2,34	<0,01	0,32	0,42	0,02
24 h	38,82	48,55a	43,01b	52,56a	4,80	47,73	50,01	46,38	1,84	<0,01	0,19	0,38	<0,01
48 h	46,33	56,07a	46,06b	59,08a	6,82	51,33b	57,90a	52,70b	3,47	<0,01	0,04	0,06	0,03
72 h	51,79	58,61b	54,99c	66,09a	5,66	54,55	58,55	56,59	2,00	<0,01	0,35	0,16	<0,01

Letra diferente las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) entre los efectos fijos ( $p < 0,05$ ). SEM: Error estándar de la media, I: inclusión, C: concentración, I x C: interacción entre la inclusión y concentración.

### Parámetros de degradabilidad

Los parámetros de degradación de la MS se describen en la tabla 5 y 6. La tasa de degradación del alimento está negativamente correlacionada con la velocidad de degradación del sustrato. Un ejemplo de ello puede observarse en los tratamientos I6C30 e I9C30, los cuales presentaron una fracción *b* alta (47,5%), acompañada de una menor tasa de degradación (0,06 y 0,07%, respectivamente). La fracción soluble (*a*), fue superior en ensilajes con inclusiones de vinaza al 9% ( $p < 0,05$ ), no se registraron diferencias entre los niveles de inclusión del 3 y 6% ( $p > 0,05$ ) (Tabla 6). La fracción *b* de la MS se aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ), aunque no hubo diferencias estadísticas con el tratamiento control ( $p > 0,05$ ) por la adición de vinaza. El nivel de inclusión al 9% y su interacción con la concentración, incrementaron la fracción *b* de los ensilajes ( $p < 0,05$ ; Tabla 6).

Por el contrario, las tasas de degradación (*c*) se disminuyeron en respuesta a la adición de vinaza con respecto al control ( $p > 0,05$ ; Tabla 6). Por otra parte, se observó que el tiempo de colonización fue afectado por el nivel de inclusión. Los tratamientos con 9% de inclusión presentaron menores tiempos de colonización que los tratamientos testigo, 3 y 6% de inclusión. Al parecer la concentración de vinaza en el ensilaje no afectó la fase lag de los microorganismos ruminales.

Cuando se consideró una *k<sub>p</sub>* de 0,02/h, la adición de vinaza en los ensilajes incrementó significativamente la

degradabilidad efectiva (DE) con respecto al tratamiento control ( $p < 0,05$ ; Tabla 6).

### Producción *in vitro* de gas y factor de partición (FP)

La producción *in vitro* de gas de los ensilajes de Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza se describen en las tabla 7 y 8. La adición de vinaza en los ensilajes incrementó el contenido de sustrato degradado en comparación con el tratamiento control ( $p < 0,01$ ; Tabla 8). La cantidad de sustrato degradado fue estadísticamente superior ( $p < 0,05$ ) en los niveles de inclusión de 9% (268,7 mg) con relación a inclusiones del 3% (207,1 mg) y 6% (232,3 mg). Los volúmenes de gas producidos no demostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) en respuesta a la inclusión y concentración de vinaza. La adición de vinaza, no alteró el volumen de gas producido con respecto al tratamiento control ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, a pesar que los volúmenes de gas producido entre los tratamientos fueron iguales, los ensilajes tratados con vinaza presentaron un factor de partición estadísticamente mayor ( $p < 0,01$ ) con respecto al tratamiento control. Inclusiones del 3% (1,02 mg/ml) y 6% (1,07 mg/ml), presentaron un factor de partición menor que cuando se incluye vinaza al 9% (1,29 mg/ml). Las concentraciones de vinaza, no condujeron a diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 5.** Parámetros de degradabilidad y degradabilidad efectiva (McDonald 22) de un ensilaje de pasto Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña.

	<i>Inclusión por concentración</i>									
	I3C20	I3C30	I3C40	I6C20	I6C30	I6C40	I9C20	I9C30	I9C40	SEM
Fracción <i>a</i>	13,3	16,3	18,1	13,0	11,0	9,78	14,4	18,3	17,4	3,11
Fracción <i>b</i>	40,0	40,0	38,0B	41,6	47,5	39,5AB	42,0	47,5	50,0A	4,30
Tasa deg ( <i>c</i> )	0,08	0,11A	0,11	0,08	0,06B	0,07	0,07	0,07B	0,08	0,02
Fase lag	4,09	5,17	5,86	6,36	4,84	6,81	60,40b	3,49	3,02	1,30
DE	45b	50aB	50aAB	46a	46aC	40bB	47b	55aA	57aB	5,22
R <sup>2</sup>	0,85	0,85	0,86	0,89	0,90	0,90	0,88	0,87	0,88	

Letra minúscula, las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro de un mismo nivel de inclusión. Letra mayúscula, las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro de un mismo nivel de concentración con diferente nivel de inclusión ( $p < 0,05$ ). SEM: Error estándar de la media, I: inclusión, C: concentración, DE: degradabilidad efectiva.

**Tabla 6.** Parámetros de degradabilidad y degradabilidad efectiva (McDonald <sup>22</sup>) de un ensilaje de pasto Maralfalfa con diferentes niveles de inclusión y concentración de vinaza de caña.

	<i>Inclusión</i>					<i>Concentración</i>					Control vs. vinaza		
	0%	3%	6%	9%	SEM	20%	30%	40%	SEM	I		C	I x C
Fracción <i>a</i>	3,68	15,9ab	11,3b	16,7a	2,91	13,6	15,2	15,10	0,90	<0,01	0,54	0,30	<0,01
Fracción <i>b</i>	40,0	39,3b	42,8ab	46,4a	3,59	41,2	45,0	42,5	1,94	<0,01	0,10	0,05	0,23
Tasa deg ( <i>c</i> )	0,12	0,10a	0,06b	0,07b	0,02	0,07	0,07	0,08	0,01	0,01	0,63	0,52	<0,01
Fase lag	4,34	5,04ab	6,00a	4,07b	0,97	5,39	4,49	5,22	0,48	0,01	0,30	0,04	0,42
DE	47,4	51,2a	47,1b	52,3a	2,76	47,8b	52,0a	50,7a	2,17	<0,01	0,01	<0,01	<0,01

Letra diferente las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) entre los efectos fijos ( $p < 0,05$ ). SEM: Error estándar de la media, I: inclusión, C: concentración, IxC: interacción entre la inclusión y concentración, DE: degradabilidad efectiva.

**Tabla 7.** Efecto de la inclusión y concentración de vinaza de caña sobre la producción *in vitro* de gas de un ensilaje de pasto Maralfalfa.

	<i>Inclusión por concentración</i>									
	I3C20	I3C30	I3C40	I6C20	I6C30	I6C40	I9C20	I9C30	I9C40	SEM
<b>SD, mg</b>	185,9B	207,1	228,1	235,2AB	246,2	215,4	265,2A	276,7	264,1	300,6
<b>VP, ml</b>	183,6	214,1	215,2	221,0	215,6	212,9	210,0	209,0	212,7	10,0
<b>FP, mg/ml</b>	1,03	0,96	1,06	1,06	1,14	1,02	1,26	1,32	1,24	0,13

Letra minúscula, las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro de un mismo nivel de inclusión. Letra mayúscula, las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro de un mismo nivel de concentración con diferente nivel de inclusión ( $p < 0,05$ ). SEM: Error estándar de la media, I: inclusión, C: concentración, SD: sustrato degradado, VP: volumen de gas producido, FP: factor de partición, mg: miligramos y ml: mililitros.



**Tabla 8.** Efecto de la inclusión y concentración de vinaza de caña sobre la producción *in vitro* de gas de un ensilaje de pasto Maralfalfa.

	Inclusión					Concentración					Control vs. vinaza		
	0%	3%	6%	9%	SEM	20%	30%	40%	SEM	I		C	I x C
<b>SD, MG</b>	136,2	207,1b	232,3b	268,7a	3,10	228,8	243,3	235,9	727,4	<0,01	0,50	0,27	<0.01
<b>VP, ML</b>	192,4	204,3	216,5	210,5	6,11	204,8	212,9	213,6	4,86	0,11	0,42	0,18	0.06
<b>FP, MG/ML</b>	0,70	1,02b	1,07b	1,27a	0,13	1,12	1,14	1,11	0,013	<0,01	0,84	0,70	<0.01

Letra diferente las medias son diferentes ( $p < 0,05$ ) entre los efectos fijos ( $p < 0,05$ ). SEM: Error estándar de la media, I: inclusión, C: concentración, IxC: interacción entre la inclusión y concentración, SD: sustrato degradado, VP: volumen de gas producido, FP: factor de partición, mg: miligramos y ml: mililitros

## Discusión

A las 24 horas de fermentación, los ensilajes con niveles de inclusión del 9%, tuvieron una degradabilidad de la MS mayor al 50%, alcanzado una degradabilidad promedio del 66% a las 72 horas de incubación, valor 22% superior al registrado para el tratamiento control (Tabla 4). Esto sugiere que el uso de vinaza facilita una degradación más acelerada del forraje de baja calidad dado el aporte de minerales (cofactores), proteína y materia orgánica degradable en rumen, que pueden generar mayor tasa de pasaje, mayor consumo de MS7 y menor generación de calor metabólico<sup>38</sup>. Hubo una reducción gradual en el contenido de FDN y FDA, al aumentar el aporte de MS de vinaza, presentando un comportamiento lineal, con efectos estadísticos significativos ( $p < 0,05$ ). Esta respuesta se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$\text{FDN} = 62,46 - 0,481 x, R^2 = 0,44$$

$$\text{FDA} = 34,99 - 0,316 x, R^2 = 0,50$$

Donde x es el aporte de MS proveniente de la vinaza.

Cuando el aporte de MS de vinaza fue cero, los valores de FDN y FDA fueron 62% y 35%, respectivamente. Luego, por cada gramo de MS de vinaza incluido, se redujeron los valores de FDN y FDA en 0,5 y 0,3%, respectivamente.

Hubo un aumento progresivo de la degradabilidad de la MS en respuesta al incremento de la inclusión de vinaza (Tabla 4), alcanzando valores máximos con el tratamiento I9C40. La degradabilidad *in vitro* de la MS tuvo un comportamiento cuadrático en respuesta al

aumento de MS proveniente de la vinaza, que se describe por la siguiente ecuación:

$$\text{Degradabilidad } in vitro \text{ de la MS} = 32,55 + 2,142 x + 0,036 x^2, R^2 = 0,69$$

Donde x es el aporte de MS proveniente de la vinaza

Así, la DIVMS fue de 32% cuando el aporte de MS de vinaza fue cero y por cada gramo de MS de vinaza adicionado, se aumentó la degradabilidad de la MS de los ensilajes en un 2,14%, siempre y cuando los demás parámetros permanezcan constantes. La mayor digestibilidad puede ser atribuida a una reducción de los constituyentes fibrosos del ensilaje y al aumento de la fracción de componentes solubles por el aporte de MS de vinaza, que ha sido reportada al mezclar leguminosas de alta proteína y bajo FDN con gramíneas de alto contenido de FDN<sup>24, 25, 32</sup>. Esto mejoraría el consumo y la degradabilidad, dado que estos parámetros presentan una correlación lineal negativa con los componentes fibrosos de la pared celular del ensilaje<sup>38</sup>.

Al correlacionar la DIVMS con algunos componentes nutricionales de los ensilajes tratados con vinaza, hubo una asociación negativa ( $p < 0,05$ ) entre el aporte de MS de la vinaza y los valores de FDN y FDA, con lo que al incrementar la adición de vinaza, se disminuirán las concentraciones de los componentes de la pared celular de la planta, lo que tiene un efecto directo sobre la degradabilidad de la MS<sup>37</sup>. También hubo una asociación lineal positiva ( $p < 0,05$ ) entre la DIVMS y el aporte de

MS de vinaza y una asociación lineal negativa de la DIVMS y los valores de FDA y FDN ( $p < 0,05$ ), dado que al aumentar la inclusión de vinaza, se reducen los contenidos de carbohidratos estructurales, aumentando la degradabilidad de los ensilajes. Los resultados encontrados son concordantes con el bajo porcentaje de FDN y FDA observado en los respectivos ensilajes, lo cual indica mayor actividad de las celulasas y hemicelulasas bacterianas en la hidrólisis y solubilización de los componentes fibrosos de cada ensilaje<sup>23</sup>.

La incorporación de vinaza de caña en los ensilajes con respecto al tratamiento control (Tabla 6), resultó en un significativo aumento en los constituyentes de la fracción soluble (*a*), que son rápida y completamente degradables en rumen. Esta mayor fracción soluble está asociada a la presencia de azúcares y proteínas remanentes en la vinaza<sup>26</sup> que habrían contribuido a incrementar esta fracción. Araiza *et al.*<sup>3</sup> encontraron valores superiores de la fracción (*a*) en ensilajes maíz-manzana tratados con melaza, siendo esto atribuible al mayor contenido de carbohidratos disponibles para los microorganismos ruminales de la melaza y la manzana.

En los ensilajes tratados con vinaza, la fracción insoluble pero potencialmente degradable (*b*), presentó un comportamiento no lineal presentando mayores valores los tratamientos con inclusión de vinaza al 9%. Esto puede deberse a que una mayor cantidad de vinaza sumado al efecto reconstitutivo del agua, pudo generar lisis de los puentes de hidrógeno que conectan las microfibrillas de celulosa tornándose más hidrofóbicas y entrelazándose con menos fuerza con la lignina<sup>37</sup>, reduciendo los valores de FDN y FDA, y permitiendo la exposición de una mayor área de superficie disponible de los  $\beta$ -glucanos y las hemicelulosas, facilitando la accesibilidad y actividad degradativa de los microorganismos ruminales a la matriz de polisacáridos<sup>5,6</sup>. Las tasas de degradación se vieron reducidas por la adición de vinaza y fueron inferiores a 0,02%/h, demostrando que los ensilajes obtenidos son de baja calidad y por tanto necesitan mayor tiempo de permanencia en el rumen para su degradación<sup>3</sup>.

La reducción en las tasas de degradación observada en este estudio implica un mayor tiempo de retención en el rumen. De igual manera, Arbabi *et al.*<sup>4</sup> encontraron efectos inversamente proporcionales en la tasa de degradación de ensilajes de cereales, al aumentar la adición de melaza al 5% y 7,5%, respectivamente. Las disminuciones en el periodo de colonización (*L*), pueden ser explicadas por un mayor contenido de materia orgánica (esqueletos carbonados) que son un sustrato de rápida utilización en la fermentación microbiana del rumen<sup>38</sup>.

La adición de vinaza de caña favoreció un aumento de la degradabilidad efectiva de la MS de los ensilajes, por el efecto aditivo de la hidrólisis de los componentes de la pared celular y el aporte de sustratos como carbohidratos, minerales y aminoácidos. Estos cambios facilitan el crecimiento de los microorganismos ruminales, debido a la sincronización de los nutrientes en el rumen, el incremento de la solubilidad de la pared celular y, en consecuencia, de la actividad de la microflora ruminal<sup>34</sup>. Los niveles de decrecientes de FDA y FDN (Tabla 2) por efecto de la inclusión de vinaza, contribuyeron a mejorar la degradabilidad del forraje y por lo tanto podrían favorecer un mayor consumo de MS<sup>7</sup>.

El factor de partición de los ensilajes se incrementó por efecto de la adición de vinaza al 9% ( $p < 0,05$ ), lo que concuerda con un alto valor de sustrato degradado (Tabla 5;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el volumen de gas producido no presentó diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) entre los ensilados evaluados. Así, la adición de vinaza potencializó la degradación de MS, probablemente por un mayor aporte de MS de vinaza y su efecto aditivo sobre la hidrólisis de los componentes de la pared celular vegetal, reduciendo los niveles de FDN y FDA (Tabla 2) en los forrajes y promoviendo el crecimiento microbiano por el aporte de aminoácidos libres, minerales y esqueletos carbonados.

## Conclusiones

La inclusión de vinaza de caña en la confección de ensilajes de Maralfalfa aumenta la degradabilidad efectiva y la degradabilidad de la MS a través del tiempo, favoreciendo la degradabilidad de la fracción soluble (*a*) y la fracción potencialmente degradable (*b*).

La adición de vinaza de caña incrementó la MS degradada en aproximadamente 9,4% con respecto al tratamiento control. Remanentes de carbohidratos y proteínas en la vinaza después del proceso de obtención de etanol, habrían favorecido el crecimiento de bacterias anaerobias en el ensilaje responsables de la mayor degradación.

La utilización de vinaza de caña como aditivo para la elaboración de ensilajes de gramíneas puede constituir una estrategia para mejorar el valor el valor nutricional de forrajes de baja calidad.

## Recomendaciones

Se recomienda realizar ensayos de palatabilidad, consumo y desempeño de animales alimentados con ensilajes incluyendo vinaza de caña como aditivo.

## Referencias

1. AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official Method of Analysis. 15th Edition. 2200 Wilson Boulevard. Arlington, Virginia, USA, 1990. p69-88.
2. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed., Arlington, VA. 2005.
3. Araiza RE, Delgado LE, Carrete FO, Medrano RH Solis SA, Murillo OM y Haubi SC. Degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad *in vitro* de diferentes formulaciones de ensilados de maíz-manzana adicionados con melaza. Avances en Investigación Agropecuaria; 2013. 17 (2): 79-96.
4. Arbabi S, Ghoorchi T. The effect of different levels of molasses as silage additives on fermentation quality of foxtail millet *Setaria italica*. Asian Journal of Animal Science; 2008. 2: 43-50.
5. Bach A, Calsamiglia S. La Fibra en los Rumiantes: ¿Química o Física?. XII Curso de especialización FEDNA. Barcelona, España. 2006. pp. 99-112.
6. Bak, J. S. Bioprocess Evaluation of Water Soaking-Based Microbiological Biodegradation with Exposure of Cellulosic Microfibers Relevant to Bioconversion Efficiency. Applied Biochemistry and Biotechnology; 2015. 1-13.
7. Barahona R., Sánchez M. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. CORPOICA Ciencia y Tecnología Agropecuaria; 2005;6 (1): 69–82.
8. Baytok, E., Karsli, A., Muruz, H. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. Turkey Journal Veterinary Animal Science; 2005. 29: 469-474.
9. Baytok, E., Muruz, H. The effects of formic acid or formic acid plus molasses additives on the fermentation quality and DM and ADF degradabilities of grass silage. Turkey Journal Veterinary Animal Science; 2003. 27: 425-431.
10. Cajarville, C., Britos, A., Garcarena, D., Repetto, J. Temperate forages ensiled with molasses or fresh cheese whey: Effects on conservation quality, effluent losses and ruminal degradation. Animal Feed Science and Technology; 2012. 171: 14–19.
11. Correa, G. Análisis de medidas repetidas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 2004.
12. Cuartas Cardona, C. A., Naranjo Ramírez, J. F., Tarazona Morales, A. M., Murgueitio Restrepo, E., Chará Orozco, J. D., Ku Vera, J., et al. Contribution of intensive silvopastoral systems to animal performance and to adaptation and mitigation of climate change. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 2014. 27(2):76-94.
13. Fernández, B., Bodas, R., López-Campos, O., Andrés, S., Mantecón, A.R., Giráldez, F.J. Vinasse added to dried sugar beet pulp: preference rate, voluntary intake and digestive utilization in sheep. Journal of Animal Science; 2009. 87(6): 2055-2063.
14. García, A., Rojas, C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. TECNICAÑA. 2006. [http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec\\_v10\\_no17\\_2006\\_p3-13.pdf](http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf).
15. Holdridge LR. Determination of world plant formations from simple climatic data. Science; 1971. 2727:367-368.
16. Jaurena, G. Contribución de la inoculación bacteriana a la fermentación de silajes de planta entera de maíz y sorgo. Revista Argentina de Producción Animal; 2008. 28 (1): 21-29.
17. Larrahondo J., Morales A., Victoria H., Jaramillo A. Compuestos orgánicos en vinaza. Tesis Magister en Ingeniería Química Orgánica. Universidad Del Valle. 2000. 113 p.
18. Loaiza, J.K. Uso de los subproductos de la agroindustria de la caña en la elaboración de dos suplementos nutricionales para rumiantes en el Valle del Cauca. Trabajo De Grado. Ingeniería de Alimentos, Universidad de Caldas. 2009.

19. Marini, R.P. Approaches to analyzing experiments with factorial arrangements of treatments plus other treatments. *Horticultural Science*; 2003. 38:117–120.
20. Martínez-Avalos, A.M.M., Mendoza, G.D., Cobos, M.A., González, S., García-Bojalil, C.M., Bárcena, R. Nutritional evaluation of cattle manure silage with molasses for ruminants. *Animal Feed Science Technology*; 1998. 70: 257–264.
21. Maza, L., Vergara, O., Paternina, E. (2011). Evaluación química y organoléptica del ensilaje de Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) más yuca fresca (*Manihot esculenta*). *Revista MVZ Córdoba*; 16(2):2528-2537.
22. McDonald, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*; 1981. 96: 251-256.
23. McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Marlow, UK: Chalcombe Publications. 1991.
24. Molina Botero, I. C., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G. A., Barahona Rosales, R. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*; 2013. 8(2):15-31.
25. Murgueitio R., E., Xóchitl Flores, M., Calle, Z., Chará, J. D., Barahona, R., Molina, C. H., Uribe T., F. Productividad en sistemas silvopastoriles intensivos en América Latina. En: Montagnini, F., Somarriba, E., Murgueitio, E., Fassola, H., Eibl, B. (ed.) *Sistemas agroforestales. Funciones productivas, socioeconómicas y ambientales*, Editorial CIPAV, Cali, Colombia, pp. 59-101.
26. Noguera, R. R., Correa, M. E. R., Posada Ochoa, S. L. Cinética de degradación ruminal del ensilaje de maíz con diferentes niveles de inclusión de vinaza. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*; 2014. 8(2):42-51.
27. Ørskov F.R., McDonald, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agriculture Science Cambridge*; 1979. 92: 499-503.
28. Ortiz, G. Digestibilidad aparente de dietas con diferentes niveles de vinaza. Editorial, CENID. Edición 2. 199 p. 2001.
29. Pereira L.G.R., Gonçalves L.C., Tomich T.R., Borges I., Rodriguez N.M. Silos experimentais para avaliação da silagem de três genótipos de girassol (*Helianthus annuus L.*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 2005. 57 (5): 690-696.
30. Pérez I., Garrido N. Tratamiento de residuos: Aprovechamiento integral de vinazas de destilería, Una revisión actual. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA, Cuba. 2006.
31. Posada S., Noguera R., Bolívar D. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 2006. 19(4): 407–413.
32. Rivera, J. E., Molina, I. C., Donney's, G., Villegas, G., Chará, J., Barahona R. Dinámica de fermentación y producción de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche. *Livestock Research for Rural Development*; 2015. 27(4): Artículo #76. Recuperado Julio 10, 2015, de <http://www.lrrd.org/lrrd27/4/rive27076.html>
33. Silva, D. J. *Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos*. Universidad Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 1990.
34. Sinclair, L.A., Garnsworthy, P.C., Newbold, J.R., Buttery, P.J. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Journal Agriculture Science Cambridge*; 1993. 120: 251-263.
35. Stemme, K., Gerdes, B., Harms, A., Kamphues, J. Beet-vinasse (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs – nutritive value and limitations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*; 2005. 89: 179–183.
36. Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa M. S., Meallan, A. B., France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*; 1994. 48:185-197.

37. Turrado, J., Saucedo, A., Ramos, J., Reynoso, M. L. Comportamiento de la fibra de celulosa reciclada en el proceso de hidratación. *Información Tecnológica*; 2008. 19 (5): 129-136.
38. Van Soest, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, NY. 373 p. 1994.
39. Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*; 1991. 74: 3583-3597.
40. Vargas, S. A., Noguera, R. R., Posada S. L. Inclusión de vinaza de caña y su efecto sobre el perfil de fermentación y calidad nutricional del ensilaje de pasto Maralfalfa (*Pennisetum sp.*). *Livestock Research for Rural Development*; 2014. 26: Artículo #216. Recuperado Julio 10, 2015, de <http://www.lrrd.org/lrrd26/12/varg26216.html>