



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**



MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS CON TRES NIVELES DE
INCLUSIÓN DE PASTA DE COCO**

Por:

MVZ Israel Méndez Cardona

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Enero 2018



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA



MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS CON TRES NIVELES DE
INCLUSIÓN DE PASTA DE COCO**

Por:

MVZ Israel Méndez Cardona

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Directora de tesis:

Dr. Héctor Aarón Lee Rangel

Comité tutorial:

Dr. Juan Carlos García López

Dra. Camelia Alejandra Herrera corredor

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Enero 2018

El trabajo titulado “**FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS CON TRES NIVELES DE INCLUSIÓN DE PASTA DE COCO** ” fue realizado por el: **MVZ Israel Méndez Cardona** como requisito parcial para obtener el obtener el grado de “**Maestro en Producción Agropecuaria**” y que fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis.

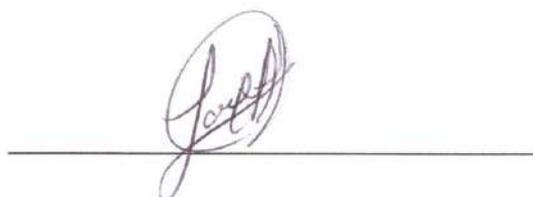
Dr. Héctor Aarón Lee Rangel
Directora de tesis

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be 'Héctor Aarón Lee Rangel'.

Dr. Juan Carlos García López
Asesor

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be 'Juan Carlos García López'.

Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor
Asesor

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be 'Camelia Alejandra Herrera Corredor'.

Ejido de Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí
a 31 enero de 2018.

DEDICATORIAS

Este trabajo es dedicado principalmente a mis padres José Concepción Méndez García y Natalia Cardona Codina que gracias a su apoyo, esfuerzo y dedicación he llegado a donde ahora estoy, gracias a la educación y valores que me han inculcado a lo largo de toda mi vida, así como la confianza que depositaron en mi para cumplir uno de los más grandes sueños que tuve; estudiar medicina veterinaria y posteriormente mis estudios de posgrado.

A mis hermanas Lorena, Diana, Ana Laura y Miriam que a lo largo de todo este tiempo y en todo ocasión he contado con su apoyo y sus consejos, y ser un ejemplo a seguir en el ámbito personal como laboral.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por estar siempre conmigo apoyándome en todo momento.

A la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas por darme esta formación profesional dentro de la medicina veterinaria.

A mi asesor de tesis, Dr. Héctor Aarón Lee Rangel por su apoyo y paciencia a este gran estudiante durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

A mis amigos que me acompañaron durante mi experimento Emanuel Martínez, Idrissa Diedhiou, María G. Guerrero y demás compañeros que se involucraron en esto.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	3
Objetivos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
La ganadería y el impacto ambiental.....	4
Principales gases de efecto invernadero.....	4
El papel del ganado en la emisión de gases de efecto invernadero.....	5
Estrategias para reducir las emisiones de metano por la ganadería.....	5
Producción de gas metano.....	5
Producción de metano a nivel mundial.....	6
Producción de metano en México.....	8
Subproductos agroindustriales.....	9
Uso de la pasta de coco en ganadería.....	9
Metanogénesis.....	10
Aplicaciones de la técnica de producción de gas.....	11
Técnicas <i>in vitro</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15

Sitio experimental.....	15
Sustratos.....	16
Animales.....	16
Líquido ruminal.....	16
Solución mineral.....	17
Técnica de producción de gas (TPG) a 72 horas.....	18
Modelo.....	19
Análisis de la ración.....	19
Estimación de CO ₂ y CH ₄	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	22
CONCLUSIONES.....	26
LITERATURA CITADA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Emisiones totales del sector pecuario a nivel mundial.....	8
2	Montaje de muestras	15
3	Obtención de líquido ruminal en ovinos.....	16
4	Solución mineral A y B.....	17
5	Medición de presiones producidas.....	18
6	IRGA LYCOR, gas analyzer.....	20
7	El efecto del tiempo sobre las variables cinéticas y la DIVMS.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Emisiones totales del sector pecuario a nivel mundial.....	8
2	Montaje de muestras	15
3	Obtención de líquido ruminal en ovinos.....	16
4	Solución mineral A y B.....	17
5	Medición de presiones producidas.....	18
6	IRGA LYCOR, gas analyzer.....	20
7	El efecto del tiempo sobre las variables cinéticas y la DIVMS.....	25

RESUMEN

Diversas evidencias muestran que la tasa de emisión de metano por fermentación ruminal, está relacionada con las características físico-químicas de la dieta, las cuales afectan el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación. Una de las alternativas por las cuales se puede reducir las emisiones de dichos gases es la búsqueda de alternativas de alimentos económicamente viables para los animales, que mejoren su productividad; este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de tres niveles de pasta de coco en la producción de gas *in vitro*. Las variables fueron la producción de gas (se ajustó con el modelo: $Y = v / (1 + \exp((2-4*s*(t - L)))$), donde: Y= volumen total de gas producido, v= volumen, s= tasa de producción de gas, t= tiempo y L= fase Lag. Se utilizaron cuatro dietas, tomando como dieta base 1) alfalfa, rastrojo, maíz, sorgo molido, asta de soya, melaza, urea y minerales; 2) inclusión de pasta de coco al 5%; 3) inclusión de pasta de coco al 10%; 4) inclusión de pasta de coco al 15%; la cantidad de muestra fue pesada y colocada dentro de 72 frascos para la medición de CO₂, esta se realizó por arrastre de gases en LI-CDR(xt system), 24 para digestibilidad, y 16 para medir la presión generada. El alto contenido de grasa las dietas pueden reducir la metanogénesis inhibiendo la actividad de los protozoarios, así como de las archaeas, además inhibe la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados que actúan como receptores de hidrógeno. El uso de ácidos grasos saturados puede ser una estrategia eficiente para mitigar la producción de metano a partir de la inhibición de la fermentación ruminal *in vitro*, teniendo en cuenta la correlación de dieta-dosis.

SUMMARY

Various evidences show that the rate of methane emission by ruminal fermentation is related to the physical-chemical characteristics of the diet, which affect the level of consumption and the frequency of feeding. One of the alternatives by which emissions of these gases can be reduced is the search for economically viable food alternatives for animals that improve their productivity; The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of three levels of coconut paste in in vitro gas production. The variables were gas production (adjusted with the model: $Y = v / (1 + \exp ((2^{-4} * s * (t - L)))$), where: Y = total volume of gas produced, v = volume, s = rate of gas production, t = time and L = Lag phase. Four diets were used, taking as base diet 1) alfalfa, stubble, corn, ground sorghum, soy horn, molasses, urea and minerals, 2) inclusion of 5% coconut paste; 3) inclusion of 10% coconut paste; 4) inclusion of 15% coconut paste; the amount of sample was weighed and placed inside 72 bottles for the measurement of CO₂, this was done by dragging gases in LI-CDR (xt system), 24 for digestibility, and 16 to measure the pressure generated. The high fat content of diets can reduce methanogenesis by inhibiting the activity of protozoa, as well as archaea, and inhibits the biohydrogenation of unsaturated fatty acids that act as hydrogen receptors. The use of saturated fatty acids can be an efficient strategy to mitigate the production of methane from the inhibition of ruminal fermentation in vitro, taking into account the diet-dose correlation.

1.-INTRODUCCIÓN

La problemática que se vive en la actualidad en nuestro país en relación al incremento en los costos de los insumos de manera general así como el de los hidrocarburos, afecta drásticamente a nuestra economía, la ganadería en México no escapa de este gran problema, la alimentación en el rubro ganadero comprende de un 50 a 70% del invertido en los sistemas de producción, por lo que en la actualidad nos encontramos en búsqueda constante de alternativas que nos permitan la disminución de los gastos por conceptos de alimentación pero sin dejar a un lado la obtención de buenos niveles de producción en un sistema rentable (Cayetano et al., 2013). Como se sabe, los sistemas de producción en rumiantes se basan en la alimentación principalmente de forrajes (40-100%), forrajes que desafortunadamente presenta muy variada digestibilidad, se cuenta con forrajes de buena digestibilidad así como media y baja (Elías, 1983).

El desempeño productivo de los rumiantes está en función del valor nutricional de la dieta que consumen. Las técnicas de producción de gases *in vitro*, utilizadas en la evaluación de alimentos para rumiantes, son de gran interés para la investigación en nutrición animal por su bajo costo y porque no son invasivas.

Estas técnicas simulan los procesos fermentativos y digestivos en el rumen, resultan menos costosas y requieren solo pequeñas cantidades de muestra. Además, invierten menos tiempo para su realización y favorecen mejor control de las condiciones experimentales (Fondevila y Barrios 2001 y López *et al.* 2007). La técnica de producción de gas ha cobrado gran auge, ya que permite seguir fácilmente la evolución de la fermentación ruminal y se utiliza mucho para predecir el valor nutritivo de los alimentos, así como para determinar el efecto de sustancias utilizadas como aditivos (Colombatto *et al.* 2007 y Giraldo *et al.* 2008).

La búsqueda de alternativas de alimentos económicamente viables para los animales, que mejoren su productividad y que no compitan con la alimentación humana; además de constituir fuentes naturales y seguras para la salud humana y la de los propios animales, constituyen algunas de las primicias que dirigen el trabajo de los nutriólogos (Calsamiglia *et al.* 2005).

HIPÓTESIS:

La adición de pasta de coco en las dietas para ovinos tiene efectos positivos sobre las variables de fermentación *in vitro*.

OBJETIVOS:

General

- Determinar el efecto la adición de pasta de coco en dietas para ovinos en la producción de gas *in vitro*.

Específicos

- Determinar los niveles de producción de gas *in vitro* a diferentes niveles de inclusión de la pasta de coco.
- Determinar la degradabilidad de cada una de las dietas.
- Obtener el porcentaje de inclusión conveniente.

REVISIÓN DE LITERATURA

La ganadería y el impacto ambiental

El incremento en la producción ganadera, el uso y extracción de combustibles fósiles, así como la producción de arroz, son las principales fuentes de CH₄ antropogénico. Para mitigar el impacto ambiental generado por las explotaciones ganaderas se han realizado estudios sobre el impacto de la alimentación del ganado y el uso de diversos compuestos naturales, con el objeto de que disminuya la producción de CH₄ (Cuartas et al., 2013).

El protocolo de Kyoto (1998), indica que entre los GEI más potentes se encuentran el CO₂, el N₂O, los hidrofluorocarbonados (HFC), los perfluorocarbonados (PFC), el hexafluoruro de azufre (SF₆) y el CH₄.

Principales gases de efecto invernadero

El CO₂ es el gas que más aporta al calentamiento global ya que sus emisiones y concentraciones son más altas a comparación de los otros gases (Montzk et al., 2011).

El CH₄ es el segundo gas de efecto invernadero más importante. Después de ser emitido permanece en la atmosfera aproximadamente de 9 a 15 años. De esta manera las concentraciones atmosféricas de CH₄ se han incrementado en un aproximado de 150% desde la era preindustrial (Steinfeld et al., 2009).

Se calculan en 320 millones de toneladas de CH₄/año la cantidad global de CH₄ antropogénico, esto es equivalente a 240 millones de toneladas de CO₂/año (Aardenne et al., 2001).

El papel del ganado en la emisión de gases de efecto invernadero.

La producción anual de CH₄ se encuentra entre 60 y 180 kg/vaca lechera. La liberación de CH₄ vía eructo en el ganado comienza aproximadamente a las cuatro semanas de edad, cuando el alimento sólido comienza a ser retenido en el retículo-rumen, incrementando la fermentación de gases conforme se va dando el desarrollo del animal (Carmona et al., 2005).

Estrategias para reducir las emisiones de metano por la ganadería.

La manipulación de la dieta del ganado se considera una posible alternativa para mitigar la producción de CH₄ y a su vez, disminuir las pérdidas energéticas del animal en este proceso, puesto que entre mejor calidad tenga el alimento, menor será el tiempo que pase en el rumen, así el proceso digestivo no gastará mayores cantidades de energía y la producción de CH₄ será menor (Aluwong et al., 2011). Una subnutrición contribuye al incremento en cuanto a la producción de gases (Carmona et al., 2005).

Producción de gas metano

Johnson y Johnson señalan que, el metano colabora en los efectos climáticos directamente, a través de su interacción con la energía infrarroja e indirectamente a través de las reacciones de oxidación atmosféricas que producen CO₂.

La agricultura y la ganadería son grandes contribuyentes en cuanto a las emisiones antropogénicas de metano, dióxido de carbono y óxido nítrico a la atmósfera. En la actualidad las concentraciones de gas metano son menores en comparación con las de CO₂, sin embargo el metano se está incrementando rápidamente y además posee un efecto 21-30

veces más contaminante con respecto al Co₂. Las tasas de acumulación de metano y dióxido de carbono en las atmosfera han

Producción de metano a nivel mundial

Steinfeld *et al.* (2009) calcularon las principales fuentes de emisión a lo largo de la cadena de suministro pecuario de la siguiente manera:

- El uso y el cambio del uso de la tierra: 2,5 Gt CO₂-eq/año, incluyendo los bosques y otra vegetación natural reemplazada por pastizales y cultivos de piensos en el Neotrópico (CO₂) y el carbono (C) liberado del suelo, así como los pastizales y tierras cultivables dedicadas a la producción de piensos (CO₂).
- La producción de piensos (excepto el C liberado del suelo): 0,4 Gt CO₂-eq/año, incluyendo el combustible fósil usado en la elaboración de fertilizantes químicos destinados a los cultivos para la producción de piensos (CO₂) y a la aplicación de fertilizantes químicos en los cultivos para piensos, y a los cultivos de leguminosas para piensos (N₂O).
- La producción animal 1,9 Gt CO₂-eq/año, incluyendo la fermentación entérica de los rumiantes (CH₄) y el uso de combustibles fósiles en las granjas (CO₂).
- La gestión del estiércol: 2,2 Gt CO₂-eq/año, principalmente a través del almacenamiento, de la aplicación y la deposición del estiércol (CH₄, N₂O).
- Procesamiento y transporte internacional: 0,03 Gt CO₂-eq/año.

El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 2007) estimó las emisiones antropogénicas de los GEI totales provenientes de la agricultura entre el 5,1 y el 6,1 Gt CO₂ eq/año en el 2005 (o del 10 al 12 por ciento del total) y por encima del 30 por ciento cuando se incluían el uso y el cambio del uso de la tierra (Smith *et al.*, 2007a).

Con base en un informe de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, 2006), es posible calcular la contribución directa del ganado a las emisiones globales diferentes del CO₂, es decir, de CH₄ y de N₂O.

Según este informe, las emisiones globales de CH₄ entérico fueron calculadas y proyectadas en 2 079 y 2 344 Mt CO₂-eq/año para los años 2010 y 2020, respectivamente; y las emisiones de CH₄ del almacenamiento del estiércol en 470 y 523 Mt CO₂-eq/año.

Los principales procesos que contribuyen a las emisiones directas de los GEI, diferentes al CO₂, provenientes del ganado son: la fermentación entérica y la descomposición del estiércol. Estos procesos constituyen la fuente principal de CH₄ y de N₂O en cualquier sistema de producción animal.

El análisis del ciclo de vida de varios sistemas de producción pecuaria han mostrado que las emisiones producidas en las granjas constituyen la mayor contribución a la huella del C en las cadenas de suministro de carne y de leche (Roy *et al.*, 2009; Beauchemin *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2010; FAO, 2010; Kristensen *et al.*, 2011; Thoma *et al.*, 2013).

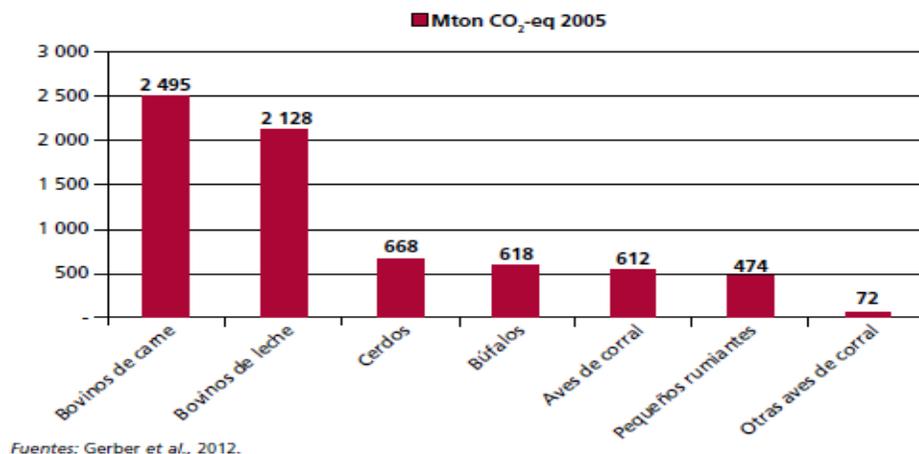


Figura 1. Emisiones totales del sector pecuario a nivel mundial.

Producción de metano en México

Las emisiones de metano en México tienen una importante contribución al calentamiento global, por lo que reducirlas debe ser parte esencial de las metas del país para combatir el cambio climático. Sin embargo en México la información sobre la producción de metano, por los rumiantes es escasa así como la investigación al respecto (Bonilla y Lemus, 2012), datos reportados por INEGI, 2013, señalan que en 2010, las emisiones de CH₄ en México fueron 7, 938.9 Gg de CH₄ lo que representa un incremento de 59.8% con respecto a 1990, donde las principales fuentes de emisión corresponden a las categorías de Desechos, Energía y Agricultura.

Las principales causas de la variación en las emisiones a lo largo del periodo de análisis se atribuyen a la dinámica del número de cabezas; el ganado vacuno de carne disminuye 5.57% mientras que las aves aumentan 162.52%. Así mismo se aprecia una reducción en las cabezas de equinos (63.99%), mulas y asnos (78.04%) y cabras (13.85%) y por otro lado un incremento de ganado lechero (59.71%), ovinos (38.65%) y porcinos (1.53%) (INEGI, 2013). En este periodo las emisiones promedio del subsector agrícola (cultivo de arroz, manejo de suelos agrícolas, quema de sabanas, quema en campo de residuos agrícolas) son de 50.6% y las del subsector pecuario del 49.4% (fermentación entérica y

manejo de estiércol), con relación a los gases las emisiones de metano ocupan en promedio 43% y las de dióxido nitroso el restante 57%.

Subproductos agroindustriales.

Los subproductos o residuos son partes que quedan de un todo, de un cuerpo luego que han sufrido un proceso de transformación natural o artificial que puede modificar o no sus características físicas químicas y estructurales iniciales. La heterogeneidad del producto final y la continua renovación tecnológica que se incorpora a los procesos de obtención de la mayoría de los subproductos hace que dentro de una misma denominación se incluyan materias que pueden diferir en sus características físico químicas. Sztem y Pravia (2001). Señalan que en términos estrictamente físicos, los residuos o subproductos son consecuencia de la transformación de la materia y la energía.

El criterio aplicable para la clasificación se consideran entre dos parámetros: origen o actividad emisora, toxicidad y peligrosidad, tamaño, naturaleza química de los materiales emisores, parámetros físicos químicos en general (Sztem y pravia, 2001; Solano et al., 2011).

Uso de la pasta de coco en ganadería.

El coco común (*cocus nucífera*) es propio de clima tropical y subtropical del océano pacífico, sin embargo su cultivo se ha extendido también por Centroamérica, el Caribe y el África tropical, pertenece a la familia de las palmáceas (El coco, 2003). Del residuo de la extracción del aceite de la pulpa seca del coco, se obtiene la harina, la cual contiene un promedio de 21.3% de proteínas. En algunas ocasiones, el suministro de pasta de coco procedente de la extracción del aceite por el método antiguo, en cuyo caso tiene un alto contenido de grasa, determinando un aumento muy ligero en el porcentaje de grasa de la leche (Flores, 1987). 1 kg de copra puede tener un valor energético equivalente a 2.5 kg de maíz y sorgo. La copra se hace atractiva para la alimentación de bovinos debido a su alto valor energético, 4.7 Mcal. De energía por kg de materia seca.(Vázquez, 1998)

Desde hace varias décadas se ha estudiado el uso de distintos tipos de ingredientes proteínicos en especies de peces comerciales como la trucha (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), la cobia (*Rachycentron canadum* L.) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), entre otras formas, utilizando ingredientes no convencionales como los desechos acuícolas y de animales terrestres o subproductos de pesquerías y agroindustriales, como las pastas de cereales a las que se ha extraído el aceite con fines comerciales (Serrano y Borquez, 2004; Chou *et al.*, 2004; Tacon y Metian, 2008).

En el país, este subproducto se emplea exclusivamente para la alimentación de animales terrestres, principalmente ganado. (Moonrthy y Viswanathan, 2006).

METANOGENESIS

Es el resultado de la fermentación de los carbohidratos en el rumen (McAllister *et al.* 1996), proceso ineficiente que produce pérdidas de 2-12% de la energía bruta que consumen los rumiantes (Bryant 1979). Además de las consecuencias para el animal, ocasiona daños al ambiente (Zinder 1992, Jhonson y Jhonson 1995, Johnson *et al.* 2000 y Solvia *et al.* 2004).

Se estima que los microorganismos del rumen producen de 300-600 L de metano por animal por año en ganado adulto. Esto representa, aproximadamente, 80 000 000 t al año. Este gas es uno de los que más contribuyen al efecto invernadero y es responsable de este fenómeno en un 18 – 21% (Moss 1992 y Moss *et al.* 2000). Por estas razones, reducir su producción proporciona beneficios económicos y medio ambientales (Teferedegne 2000).

Para reducir la producción de metano en el rumen se han utilizado diversos mecanismos (Demeyer y Fievez 2000, Anderson *et al.* 2003, Carmona *et al.* 2005 y beauchemin *et al.* 2008). Una de las más utilizadas es la adición de químicos, entre los que se encuentran análogos halogenados de metano, antibióticos ionoforos, ácido grasos insaturados, ácido fumarico y otros compuestos que tienen efectos directos o indirectos en la metanogénesis ruminal. Todas estas sustancias disminuyen significativamente la producción de metano.

Entre el uso de aceites, los que más se emplea son los de linaza, coco, canola, rábano, girasol y aceites de pescado, basados en ácido n-3- eicosapentanoico (EPA) y ácido n-3- decosahexanoico (DHA) (Demeyer y van Nevel 1979, Gil 2004, Soliva et al. 2004, Beauchemin y McGinn 2006 y Beauchemin et al. 2008).

El aceite de coco se ha informado como un producto capaz de inhibir la metalogénesis, debido a su contenido elevado de ácidos grasos de cadena larga. Su contenido en ácidos grasos de cadena larga. Su contenido en ácidos grasos saturados es aproximadamente de 90%. Su composición media en ácidos grasos es: mirístico (17 %), palmítico (9 %), esteárico (2.5 %), oleico (7 %), linoleico (1.8 %) (Blas et al. 2003).

Aplicaciones de la técnica de producción de gas

La técnica de medición de la producción de gas ha sido propuesta para evaluar el ranking del valor nutritivo en los planes de mejoramiento genético y la comprensión de las interacciones genotipo- ambiente de especies empleadas en los sistemas de producción animal.

Chamberlain (1994), utiliza la técnica de producción de gas como un indicador de la actividad microbiana, debido a que ésta es posible gracias a la energía disponible en rumen contenida en los alimentos. En este sentido la información que se puede obtener a partir de los datos de producción de gas resulta de gran utilidad dado el potencial de conocimiento del ecosistema ruminal.

Una aproximación alternativa y poco explorada, constituye el empleo de sistemas de producción de gas *in vitro* como indicadores del status interno del rumen, reflejando por ejemplo cambios en el nivel de llenado y potencial fermentativo producto de diferentes estrategias de alimentación (Chilibroste *et al.*, 1999), lo que podrían ser empleados para describir cambios en la capacidad digestiva *in vivo* o clarificar limitaciones digestivas de un sustrato.

Los alimentos de baja tasa de producción de gas presentan mayores valores de digestibilidad *in vivo* que los que sugieren los datos de producción de gas (Menke *et al.*,

1979). Chilibroste *et al.* (1997), encontró estrechas correlaciones entre el tamaño de los pools identificados mediante los datos de producción de gas y las fracciones nutricionalmente importantes determinadas mediante la técnica de la bolsa de nylon (fracción indegradable y soluble). Blümmel y Ørskov (1993) no encontraron buena correlación entre la tasa de producción de gas y de pérdida de materia seca obtenida por la técnica de la bolsa de nylon, no obstante se encontró alta correlación entre el total de producción de gas y consumo de materia seca, materia seca digestible y tasa de crecimiento de ovinos.

Schofield *et al.*, (1994) proponen el modelo no lineal logístico con múltiples fases asumiendo que la tasa de producción de gas de un pool es proporcional a la masa microbiana y al nivel de sustrato disponible, y da un valor cuantitativo satisfactorio de las fracciones que tienen un comportamiento diferencial.

$$V_i = \frac{V_p}{1 + \exp(2+4Sp(Lp - t_i))} n$$

Dónde: V_i = volumen de gas al tiempo t_i , V = máximo volumen de gas del pool correspondiente, S = tasa constante, llamada tasa específica de producción de gas, L = es una constante de integración equivalente al término Lag. p = es utilizado

para identificar los diferentes pools. n = número de pools.

Bruni (1997), Bianco (1997), Pichard *et al.* (1997) y Bruni y Pichard (1998), utilizaron este modelo, para describir la producción de gas de diferentes tratamientos de pared celular aislada de diferentes especies como sustrato estándar.

El efecto de los lípidos sobre la digestibilidad ruminal depende de la composición de la grasa y de la forma en que se libera en el rumen (DOHME et al., 2001). Las dietas de alto contenido en grasa pueden reducir la metanogénesis al inhibir protozoos y Archaea, y por la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados, que actúan como receptores del hidrógeno (JOHNSON, JOHNSON, 1995).

Soliva et al. (2011) demostraron que el aceite de ajo es eficiente en la mitigación del metano sin perjudicar notablemente la fermentación de nutrientes microbianos. O'Brien et al. (2014) han demostrado que la efectividad de los ácidos grasos en la mitigación de la producción de metano o la inhibición de la fermentación ruminal *in vitro* es tanto dietética como dosis-dependiente.

TÉCNICAS *IN VITRO*

Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento, que limitan su disponibilidad para el rumiante, determinan la proporción de los nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen. La degradación de un alimento resulta de fuerzas competitivas que actúan simultáneamente, tasa de pasaje y tasa de degradación (Ellis, 1978; Van Soest, 1994; Mertens, 1993).

La medición de las tasas de digestión resulta cada vez más importante, debido al avance ocurrido en los nuevos sistemas de alimentación, (Fox *et al.*, 1992; Russel *et al.* 1992; Sniffen *et al.* 1992; NRC,1996) en los que la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal, es calculada en base a la competencia entre tasa de digestión (Kd) y tasa de pasaje (Kp). El sistema de Cornell divide los carbohidratos en cuatro fracciones o pools (A, B1, B2 y C) y utiliza el tamaño y las tasas de digestión de esas fracciones con el objetivo de predecir la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal. La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida. Con el objetivo de obtener sistemas reproducibles y repetibles, se han propuesto

sistemas estáticos y estandarizados. Para el estudio de la digestión ruminal, la mayoría de los sistemas utilizan inóculo microbiano.

Las técnicas *in vitro* o *in situ* empleadas en estudios de cinética de digestión, basadas en análisis de residuos no digeridos o fermentados, a diferentes tiempos de incubación, presentan una serie de desventajas, entre las que se puede mencionar, alto costo, no es posible determinar el rol de los componentes solubles del forraje y es muy difícil el estudio de las fases tempranas de fermentación (Pell y Schofield, 1993).

La degradación de un alimento resulta de fuerzas competitivas que actúan simultáneamente, tasa de pasaje y tasa de degradación (Ellis, 1978; Van Soest, 1994; Mertens, 1993).

La medición de las tasas de digestión resulta cada vez más importante, debido al avance ocurrido en los nuevos sistemas de alimentación, (Fox *et al.*, 1992; Russel *et al.* 1992; Sniffen *et al.* 1992; NRC,1996) en los que la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal, es calculada en base a la competencia entre tasa de digestión (Kd) y tasa de pasaje (Kp). El sistema de Cornell divide los carbohidratos en cuatro fracciones o pools (A, B1, B2 y C) y utiliza el tamaño y las tasas de digestión de esas fracciones con el objetivo de predecir la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal.

La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida. Con el objetivo de obtener sistemas reproducibles y repetibles, se han propuesto sistemas estáticos y estandarizados. Para el estudio de la digestión ruminal, la mayoría de los sistemas utilizan inóculo microbiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio Experimental

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Bromatología y en las instalaciones de la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El experimento se dividió en: determinación de la producción de gas *in vitro* y determinación de la digestibilidad *in vitro* de cuatro dietas experimentales con pasta de coco para determinar los parámetros de la cinética de fermentación y estimación de la producción de gases menores (CH_4 , N_2 , H_2 y otros).

Sustratos

Se utilizaron las dietas experimentales como sustratos para las incubaciones *in vitro* (Cuadro 2) formuladas de manera isoproteica e isoenergetica. Por otro lado se tomó una muestra de 100 gramos de cada dieta para su posterior análisis bromatológico, las muestras se secaron a 65°C por 24 horas una vez secas las muestras se molió a tamiz con malla de 1 mm de diámetro.



Figura 2. Montaje de muestras

Animales

Se utilizaron ocho ovinos Rambouillet como donadores de líquido ruminal con una edad promedio de 6 meses, los cuales se alojaron en corrales de 1.5 x 1 m, dispuestos con comedero y bebedero. Los cuales fueron divididos en cuatro tratamientos de acuerdo a cada dieta experimental. Previo al inicio del experimento fueron sometidos a un periodo de adaptación de 10 días.

Líquido ruminal

Se extrajeron 100 ml del contenido ruminal en ayuno de cada animal donante. La recolección del líquido ruminal se llevó a cabo mediante el uso de una sonda ruminal, conectada a una bomba de vacío y un matraz Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad. Posterior a la recolección del líquido ruminal este se transportó en recipientes de plástico estériles con capacidad de 150 ml dentro de un termo a 39°C hasta el laboratorio, donde se filtró mediante cuatro capas de gasa y se mezcló con una solución mineral reducida en proporción de 1:9 v/v.



Figura 3. Obtención de líquido ruminal en ovinos

Cuadro 1. Dietas experimentales ensayo *in vitro*.

Ingredientes g/kg	Tratamientos			
	Control	PCc 5%	PCc 10%	PCc 15%
H. de alfalfa	280	198.3	146.7	145.2
Rastrojo de maiz	150	150	150	150
Maiz entero	270	250	250	210
Sorgo molido	150	130	130	130
Pasta de soya	50	86	88.3	79.8
Pasta de coco	0	50	100	150
Melaza	75	75	75	75
Urea	10	10	10	10
Minerales ¹	50	50	50	50

Solución mineral

La solución mineral utilizada es una adaptación de la técnica descrita por Tilley y Terry (1963), que consiste en:

Solución A: KH_2PO_4 10.0 g/l, MgSO_4 0.5 g/l, NaCl 0.5 g/l, CaCl_2 0.1 g/l, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0.5 g/l.

Solución B: Na_2CO_3 15.0 g/l, Na_2SO_4 1.0 g/l.



Figura 4. Solución mineral A y B.

TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS (TPG) A 72 HORAS.

Se usó la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994) para evaluar la fermentación *in vitro*. Se utilizaron frascos de vidrio de 120 ml color ámbar, a los cuales se les agregó 0.5 g de sustrato (dietas experimentales) y se les adicionaron 90 ml de inoculo, así como un flujo constante de CO₂, posteriormente se utilizaron tapones de hule y se sellaron con arillos de aluminio para ser colocados en incubación a baño maría a 39°C, se cubrió para mantener los frascos protegidos de la luz directa. La presión de gas generada por la fermentación del sustrato se midió con un nanómetro manual (escala de 0 a 1 kg cm⁻²) provisto de una llave trifásica y aguja hipodérmica, igualando a cero la presión interior en cada lectura. Las lecturas se realizaron a 0, 30 min, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 y 96 hr horas de fermentación.

Para cada tratamiento se incluyeron dos frascos como blancos sin sustrato y con inoculo ruminal en bolsas ankom (Ø poro 47 µm) se secaron a 60°C por 24 h; las muestras se pesaron para calcular la materia seca (MS) residual y calcular la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS).



Figura 5. Medición de presiones producidas.

Modelo

Las unidades de presión (kg/cm²) se transformó en volumen y la producción de gas acumulado se ajustara con el modelo propuesto por Menke y Steingass (1988):

$$V_o = V_m / (1 + \exp^{-2.4 * s * (t - L)})$$

Donde: V_o = Volumen acumulado ml/g MS, V_m = Volumen máximo de gas (ml/g-1), s = tasa de producción de gas (h⁻¹), L = fase lag (h).

Análisis de la ración

Las dietas fueron analizadas mediante la técnica descrita por AOAC, (1965) para materia seca (MS), proteína cruda (PC) y extracto etéreo (EE).

Estimación de CO₂ y CH₄

En el último periodo de muestreo se tomó una muestra del líquido ruminal para otra serie incubaciones *in vitro*, usando el mismo procedimiento de la técnica producción de gas, se medirá el gas producido por la fermentación del sustrato a las 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 horas de incubación. Los valores de presión espacial en el frasco se transformaron en volúmenes de gas mediante la ecuación de regresión lineal descrita por Elmasry et al. (2016):

$$V = (P + 0.0186) (0.0237)^{-1}$$

Donde: P = presión en el momento (kg/c³)

La cuantificación de CO₂ se realizó mediante una cámara dinámica usando Infrared gas analyzer (IRGA, LICOR®). IRGA o Infra-red Gas Analyzer es un haz de luz infrarroja que incide sobre una muestra de aire dentro de un recinto o “IRGA bench”. Como el

dióxido de carbono tiene una banda de absorción muy fuerte a en el infrarrojo, los IRGA's emiten de forma importante a ese espectro de onda. Dependiendo de dicha absorción, la radiación que llega a un sensor decrece y se puede conocer que cantidad de moléculas de CO₂ existe en la muestra de gas.

La proporción de volumen de metano y CO₂, se calculó mediante la diferencia entre la concentración de CO₂ y CH₄ (con gases menores) .

Se calculó la energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) de acuerdo a la ecuación establecida por Menke y Steingass (1988):

$$EM=2.20+0.1357PG24+0.0057CP+0.0002859EE2$$

Donde: PG gas producido después de 24 horas de incubación; PC: proteína cruda de la dieta; EE: Extracto etéreo de la dieta.

Se calcularon los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en relación a la PG a las 24h siguiendo la ecuación de Getachew et al. (2002):

$$\text{mmolAGCC} = -0.00425 + 0.0222 (\text{PG24}).$$



Figura 6. IRGA LYCOR, gas analyzer.

Análisis estadístico

El diseño experimental en todos los ensayos fue completamente al azar. Para la determinación de la fermentación y digestibilidad *in vitro* de cuatro dietas el modelo estadístico incorporo un análisis de comparación de media repetidas en el tiempo. Se analizaron mediante una prueba de polinomios ortogonales con una significancia de ($P > 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca se muestran en el Cuadro 2. Hubo efectos cuadráticos ($P < 0.05$) para la digestibilidad *in vitro* de materia seca (IVDMD). La pasta de coco disminuye la DIVMS en su máximo nivel. Lima *et al.* (2017) observaron que la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica osciló entre 35.91 y 61,18% en dietas de 0 y hasta 30% de pasta de coco, la máxima degradabilidad de la materia seca fue para el grupo control, coincidiendo con los valores encontrados en esta investigación. El efecto del contenido de grasa en la pasta de coco afecta la digestibilidad debido a que forma una barrera entre las bacterias y los microorganismos ruminales (DOHME *et al.*, 2001). En el cuadro 3 se observan los resultados de la producción de gas *in vitro*. El volumen de producción de gas (V_m) no presenta efecto por la adición de pasta de coco ($P < 0.05$). La tasa de producción de gas (s) se incrementa de forma lineal ($P < 0.05$) conforme se incrementa la cantidad de pasta de coco en las dietas. La fase Lag (L) no muestra diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos. El tratamiento con 10% tuvo la máxima producción de gas 188.7 mL g^{-1} superior a cualquier otro tratamiento. Pero el tratamiento con 15% muestra la mínima producción de gas 153.2 mL g^{-1} con lo que se confirma el potencial que tiene el aceite de coco para inhibir la fermentación ruminal (Lima *et al.*, 2017). Hollmann y Beede (2014) mencionan que las dietas con 2.5% aceite de coco disminuyó la producción de leche correlacionándolo con una disminución en la digestibilidad de la materia seca y de la fibra detergente neutro. La Figura 1 muestra la tasa fraccionaria de gas de las dietas experimentales. Las tasas más altas, independientemente de la dieta, se obtuvieron en la dieta con mayor cantidad de pasta de coco.

El uso de pasta de coco en dietas para borregos presenta un efecto cuadrático ($P < 0.05$), teniendo un valor máximo de producción (34.03%) en la dieta con 10% de pasta de coco. Aunque no se observa diferencias ($P < 0.05$) para los valores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y energía metabolizable (EM), se observa un incremento numérico en la energía metabolizable para la dieta con 10% de pasta de coco.

El alto contenido de grasa las dietas pueden reducir la metanogénesis inhibiendo la actividad de los protozoarios, así como de las archaeas, además inhibe la biohidrogenación

de ácidos grasos insaturados que actúan como receptores de hidrógeno (JOHNSON, 1995). Soliva et al. (2011) demostró que el aceite de ajo es más eficaz mitigando la producción de metano sin disminuir la eficiencia en la utilización de nutrientes. O' Brien et al. (2014) demostraron que el uso de ácidos grasos saturados puede ser una estrategia eficiente para mitigar la producción de metano a partir de la inhibición de la fermentación ruminal *in vitro*, teniendo en cuenta la correlación de dieta-dosis.

Cuadro 2. Efecto del nivel de pasta de coco la sobre la digestibilidad *in vitro* (DIVMS) de dietas para borregos.

Tratamiento	Horas					
	0	6	12	24	48	72
Testigo	33.453	44.178	53.496	61.247	63.774	64.918
5% Pasta de coco	29.15	40.833	50.055	56.163	56.281	63.57
10% Pasta de coco	42.639	36.393	40.732	46.953	56.125	65.218
15% Pasta de coco	28.354	38.63	45.884	48.378	57.309	61.287
EEM	6.935	1.024	2.903	4.831	2.647	5.832

Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes (P<0.05). α, efecto lineal P >0.05; ¥ efecto cuadrático (P >0.05)

Cuadro 3. Efecto del nivel de pasta de coco sobre la producción de gas *in vitro*, digestibilidad, producción de metano, dióxido de carbono, energía metabolizable y producción de ácidos grasos de cadena corta.

Variable	Testigo	5% Pasta de coco	10% Pasta de coco	15% Pasta de coco	SEM
Vm, mL g ⁻¹	173.8	179.05	188.7	153.02	4.51
s, mL g ⁻¹ , α	0.029	0.029	0.031	0.3	0.01
L, h	5.27	4.94	5.17	5.68	0.25
DIVMS,%	64.918	63.57	65.218	61.287	5.832
CO ₂ , %, ¥	68.79	66.84	65.96	72.98	1.78
CH ₄ , %, ¥	31.2	33.15	34.03	27.01	1.29
EM, MJ/Kg MS, α	15.49	15.99	17.32	14.20	
AGCC, mmol L, α	2.16	2.24	2.46	1.95	0.01

Vm: volumen máximo de gas; L:fase lag; s:tasa de producción de gas; DIVMS: digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes (P<0.05). α, efecto lineal P >0.05; ¥ efecto cuadrático (P >0.05).

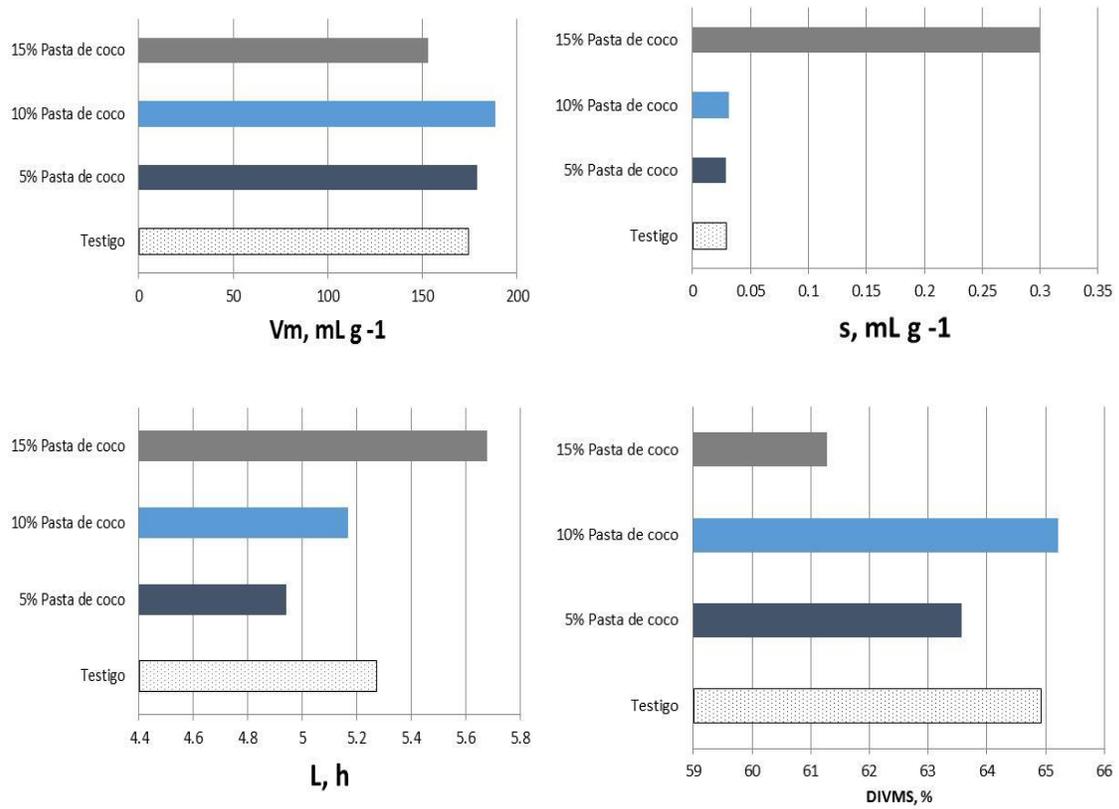


Figura 2. El efecto del tiempo sobre las variables cinéticas y la DIVMS. a) Volumen máximo de gas (V_m); B) tasa de producción de gas (s); C) fase lag (L); d) digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS).

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la implementación de la pasta de coco en la dieta de ovinos tiene un efecto benéfico en cuanto a los niveles de inclusión ya que a mayor porcentaje de inclusión obtuvimos una menor tasa de degradabilidad, aunado a una elevada producción de gas, así como el tiempo de degradación a nivel ruminal, pudiendo ser evaluada en cuanto a su funcionalidad en trabajo de campo.

7. LITERATURA CITADA

- Anderson, R.C., Callaway, T.R., Van Kessel, J.A.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S. & Nisbet, D.J. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresource Technology*. 90:59
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., Mara, F. & Mc Allister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement's review. . *Australian J. Experimental Agric.* 48:21
- Bianco A. 1997. Efecto del perfil nitrogenado de ensilaje de alfalfa, sobre la cinética de fermentación ruminal. Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Magister en Producción Animal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile
- Bruni M. 1997. Utilización de dietas basadas en ensilajes. Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Magister en Producción Animal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile
- Bruni, M. y Pichard, G. 1998. Cinética de fermentación ruminal in vitro de pared celular incubada con diferentes extractos de ensilajes de alfalfa.. In *Revista argentina de Producción Animal*.22 Congreso Argentino de Producción Animal. Rio cuarto Córdoba (p 68)
- Bryant, M.P. 1979. Microbial methano production: Theoretical aspect. *J. Anim. Sci.* 48:193.
- Calsamiglia, S., Castillejos, L. & Busquet, M. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de Especialización FEDNA. Madrid. España. Pp. 161-185

- Carmona, J.C., Bolívar, D.M. & Giraldo, L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera. Alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Rev. Coloma. Cienc. Pec.18:49
- Cayetano, J.A., Salem, A.Z. M., Marie Zcurrena, B. M. A., Rojo, R., Cerrillo-Soto, M. A., Gado, H., & Camacho, L. M. (2013).
- Chamberlain, A.T. 1994. The gas production capacity of purified chemicals and feedstuffs when incubated in vitro with rumen microbes as a posible indicator of energy availability in the rumen. In: British Society of Animal Production. Jubilee Winter Meeting. Paper N° 91.
- Chilibroste, P., Williams, B.A. Tamminga, S. and Calabro, S. 1999. The use of cumulative gas production technique to characterize changes in the fermentation characteristics of rumen contents following variable periods of starvation and grazing in dairy cows. Animal Science,69: 647-655.
- Chou, R.L., B. Y. Her, M.S. Su, G. Hwang, Y. H. Wu y H. Y. Chen. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture 229 (1-4): 325-333.
- 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
- Demeyer, D.I. & Van Nevel, C.J. 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. Br. J. Nutr. 42:515
- Demeyer, D.L. & Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogènèse. Ann. Zootech. 49:95
- Dohme, F. et al. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Letters in Applied Microbiology, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2001.

DOHME, F. et al. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Letters in Applied Microbiology, v. 32, n. 1, p. 47–51, 2001.

Effect of adding *Salix babylonica* Extracts and Exogenous Enzymes to Basal Diets on the Meat Quality of Growing Suffolk Lambs#. Animal nutrition and Feed Technology, 13(3): 373-380.

Ellis, W.C. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. Journal of Dairy Science 61:1828.

El Coco uno de los frutos más grasos y exóticos.
http://www.consumer.es/web/es/nutricion/aprender_a_comer_bien/guía_alimentos/frutos_y_derivada/35602jsp.2003

Fondevila, M. & Barrios, A. 2001. The gas production technique and its application to the study of the nutritive value. Cuban J. Agric. Sci. 35:197

Fox, D.G. Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Russell, J.B., and Van Soest, P.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. 1992. Cattle diets and diets adequacy. Journal of Animal Science 70: 3578-3596.

Gil, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feed lot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. En: <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>. Consultado: 4 de agosto de 2004.

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

HOLLMANN, M.; BEEDE, D.K.. Comparison of effects of dietary coconut oil and animal fat blend on lactational performance of Holstein cows fed a high-starch diet. Journal of Dairy Science. v. 95, n. 3, p. 1484– 1499, 2012

- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M. & Branine, M.E. 2000. Ruminants and other animals. Cap. 8. En: Atmospheric Methane: It's Role in the Global Environment. Ed. M.A.K. Khalil and Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany. p. 112
- Johnson, K.A. & Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483
- Johnson, K.A.; Johnson, D.E. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, v.73, n. 8, p.2483-2492, 1995.
- Lima TJ, Paula TA, Castagnino PS, Teixeira IAMA, Beelen RN, Guimarães Beelen PM. 2017. Kinetic and in vitro ruminal fermentation characteristics of copra meal diets with different fat levels. *Acta Veterinaria Brasilica* 11: 35-41.
- 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
- McAllister, T.A., Okine, E.K., Mathison, G.W. & Cheng, K.J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76:23.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider. 1979. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Science* 93:217- 222.
- Mertens, D. R. 1993. Rate And Extent Of Digestion. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Ed. Forbes J.M. and France J. CAB International. University Press. Cambridge.

- Moonrthy M. y K. Viswanathan. 2006. Feeding value of extracted coconut meal for White lefhorn layers. *International Journal of Poultry Science* 5: 1040-1045.
- Moss, A. 1992. Methane from ruminants in relation to global warming. *Chemistry and Industry*, May 4, No 9. p. 334.
- Moss, A.R., Jouany, J.P. & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231.
- National Research Council,1996. Nutrient requirements for beef cattle, seventh edition. National Academy Press.
- O'brien M. et al. Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Animal Production Science*. V. 54, n. 1, p. 141–157, 2013
- O'BRIEN M. et al. Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Animal Production Science*. V. 54, n. 1, p. 141–157, 2013.
- Pichard, G. Jaurena, G. and Bruni, M. 1997. Monitoring kinetic of readily Fermentable Components By means of In vitro Gas Production. In *Proceeding of the XVIII International Congress*, Canada, June, 1997.
- Russel. J.B:., O'Connor, J.D., Fox,D.G. Van Soest, P.J.,and Sniffeffen, C.J.1992.. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science* 70:3551-3561.
- Schofield, P. Pitt, R.E. and Pell, A.N., 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 1994. 72: 2980-2991.
- Serrano, G. E. R. y R. A. Borquez. 2004. Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino blanco *Lupinus albus* en dietas extruidas para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*: efecto sobre los índices reproductivos y la composición de ácidos grasos en el músculo. Universidad Católica de Temuco, Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Escuela de Acuicultura.72 p.

- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G. and Russell, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and Protein availability. *Journal of Animal Science* 70:3562-3577
- Soliva, C.R., Meile, L., Hindrichsen, I.K., Kreuzer, M. & Machmüller, A. 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe*. 10:269
- SOLIVA C.R. et al. Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with galic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *The British Journal of Nutrition*. v. 106, n. 1, 114–122, 2011.
- Tacon, A. G. J. y M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158.
- Teferedegne, B., 2000. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 59:209. Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Second Edition. Cornell University Press. Ithaca, N.Y.
- Vázquez, M, R. 1998. Comportamiento de toretes y vaquillas suizo pardo alimentados con diferentes niveles de Copra. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. Pág. 2 – 9
- Zinder, S.H. 1992. Methanogenesis. En: *Encyclopedia of Microbiology*, Lederberg, J. Ed. Academic Press. San Diego. Vol. 3. p. 81