

Use of the gas production technique to predict the relation between the intake level and indicators of *in vitro* ruminal fermentation.

Uso de la técnica de producción de gas para predecir la relación entre el nivel de consumo e indicadores de la fermentación ruminal *in vitro*.

R. Rodríguez, Juana L. Galindo, J. Iraola and Sarai Gómez

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: rrodriguez@ica.co.cu

The potentialities of the *in vitro* gas production technique were evaluated as a method to predict the relations between the simulated intake level and fermentation indicators. The *in vitro* simulated intake levels were 1.9, 2.1, 2.2 and 2.5% live weight. The diets were made with fixed amounts of maize meal and grass, while the amount of sugarcane meal varied (equivalent to 0; 6.0, 10.0 and 20.0 g kg⁻¹ LW). At 24 h, the degradability of dry matter and nitrogen, the gas production and short chain fatty acids (total and individual), synthesis efficiency of microbial biomass and NH₃ concentration were determined. An experimental randomized block design was used, the Pearson correlation indexes were determined among the studied variables and multiple linear regressions were performed to study the functional relation between the simulated intake level (response variable) and the variables of the degradability of dry matter, gas production, total short chain fatty acids and synthesis efficiency of microbial biomass (predictor variables). The Pearson correlation between the simulated intake level and fermentation indicators showed a high positive correlation for gas production, short chain fatty acids (acetic, butyric and totals) and synthesis efficiency of microbial biomass ($P < 0.05$). There was high negative correlation with the degradability of dry matter and nitrogen ($P < 0.01$). The multiple linear regression equations showed that R² improved when the predictor variables increased from 2 to 3. The dry matter degradability showed the highest values of partial R², although when excluding the gas production at 24 h explained 65.7% of the variability. The obtained results suggest that the voluntary intake levels that were simulated *in vitro* from the data of dry matter degradability and gas production can be predicted, while the inclusion of total short chain fatty acids and the synthesis efficiency of microbial biomass as predictor variables increased the determination coefficient of the obtained models.

Key words: *degradability, fermentation, sugar cane, prediction, models*

Grasses are the natural food of ruminants and represent the most abundant and least expensive food source. However, when the animals are stabulated at night, grazing intake is limited and there is a need to provide an alternative source of food that compensates the non-intake grass during the hours of stabulation, as it is known that variations in the intake and modifications in the feeding patterns determine the productive efficiency and affect the individual gain of the animals (Iraola *et al.* 2013).

There are numerous prediction models of voluntary intake in ruminants from indicators measured *in vivo* (Pulina *et al.* 2013). However, the study of the

Se evaluaron las potencialidades de la técnica de producción de gas *in vitro* como método para predecir las relaciones que existen entre el nivel de consumo simulado e indicadores de la fermentación. Los niveles de consumo simulados *in vitro* fueron de 1.9, 2.1, 2.2 y 2.5 % peso vivo. Las dietas se conformaron con cantidades fijas de harina de maíz y pasto, mientras varió la cantidad de harina de caña de azúcar (equivalente a 0; 6.0, 10.0 y 20.0 g kg⁻¹ PV). A las 24 h se determinó la degradabilidad de la materia seca y el nitrógeno, la producción de gas y ácidos grasos de cadena corta (totales e individuales), eficiencia de síntesis de biomasa microbiana y concentración de NH₃. Se empleó un diseño experimental de bloques al azar, se determinaron los índices de correlación de Pearson entre las variables estudiadas y se realizaron regresiones lineales múltiples para estudiar la relación funcional entre el nivel de consumo simulado (variable respuesta) y las variables de la degradabilidad de la materia seca, producción de gas, ácidos grasos de cadena corta totales y eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (variables predictoras). La correlación de Pearson entre el nivel de consumo simulado e indicadores de la fermentación mostraron alta correlación positiva para producción de gas, ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico y totales) y eficiencia de síntesis de biomasa microbiana ($P < 0.05$). Hubo alta correlación negativa con la degradabilidad de la materia seca y el nitrógeno ($P < 0.01$). Las ecuaciones de regresión lineal múltiple mostraron que mejoró R² al incrementar de 2 a 3 las variables predictoras. La degradabilidad de la materia seca mostró los mayores valores de R² parcial, aunque al excluirla la producción de gas a las 24 h explicó 65.7 % de la variabilidad. Los resultados obtenidos permiten sugerir que se pueden predecir los niveles de consumo voluntario que se simularon *in vitro* a partir de los datos de degradabilidad de la materia seca y la producción de gas, mientras que la inclusión de los ácidos grasos de cadena corta totales y la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana como variables predictoras incrementaron el coeficiente de determinación de los modelos obtenidos.

Palabras clave: *degradabilidad, fermentación, caña de azúcar, predicción, modelos*

Los pastos constituyen el alimento natural de los rumiantes y representan la fuente alimentaria de mayor abundancia y de menor costo. Sin embargo, cuando se estabulan los animales en la noche se limita el consumo en pastoreo y se impone la necesidad de brindar una fuente de alimento alternativo que compense el pasto no consumido durante las horas de estabulación, pues se conoce que las variaciones en el consumo y modificaciones en los patrones de alimentación determinan la eficiencia productiva y afectan la ganancia individual de los animales (Iraola *et al.* 2013).

Existen numerosos modelos de predicción del consumo voluntario en rumiantes a partir de indicadores

relation between the voluntary intake level of food and physiological or productive indicators, under production conditions, has the limitation that treatments with lower intake levels would cause economic effects. This does not make recommendable the use of experimental designs *in vivo* as a routine method for these researches. This problem explains the challenge of designing *in vitro* experiments, in which intake levels can be simulated and determined their effects on physiological and biochemical indicators of fermentation and eventually infer possible productive effects.

The gas production technique is a procedure that is applied routinely for the food evaluation. It has also been used to predict *in vivo* food voluntary intake (Blümmel and Becker 1997 and Blümmel *et al.* 1997, 2005).

The gas production technique is an *in vitro* batch system, in which the fermentation products gradually accumulate. Normally, for the implementation of this technique, equal amounts of dry matter (DM) or organic matter (OM) of the treatments to be compared are incubated. The indicators that are measured are expressed per unit of DM or OM incubated.

However, it has never been attempted to simulate different intake levels from the incubation of different amounts of substrates, in addition to evaluating their effect on the *in vitro* fermentation indicators that are normally measured. To simulate different intake levels in this *in vitro* system, the different amounts of the diets to be evaluated should be incubated, so that the amounts of substrate to be fermented are a reflection of the intake levels to be simulated.

Subsequently, the indicators measured in absolute units are expressed, and not per DM or OM unit incubated, as is normally done.

To achieve new advances in researches, studies that use multiple research methodologies to deal with complex systems and measure multiple variables are needed (McNamara *et al.* 2016). Therefore, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* gas production technique, as a method to predict the relations that exist between the simulated intake level (SIL) and fermentation indicators, when several practical situations of animals feeding were represented in a nocturnal stabulation system.

Materials and Methods

Experimental procedure. To design the SIL to be evaluated *in vitro*, it was started from a group of assumptions. It was established that the control treatment was the diet that covered the DM requirements of male animals in the pre-fattening phase, with an average live weight of 270 kg (LW), which make a voluntary intake of 5.9 kg of DM, 2.2 % of its LW (Martín 1981). The control diet would be constitute of three elements: 1.0 kg of maize meal (25% of the total DM requirement), 10 g of sugarcane meal per kg of live weight of the

medidos *in vivo* (Pulina *et al.* 2013). Sin embargo, el estudio de la relación entre el nivel de consumo voluntario de alimento e indicadores fisiológicos o productivos, en condiciones de producción, tiene la limitación de que los tratamientos con menores niveles de consumo provocarían afectaciones económicas. Esto no hace recomendable el uso de diseños experimentales *in vivo* como método de rutina para estas investigaciones. Este problema plantea el reto de diseñar experimentos *in vitro*, en los que se puedan simular niveles de consumo y determinar sus efectos en indicadores fisiológicos y bioquímicos de la fermentación e inferir a la postre posibles efectos productivos.

La técnica de producción de gas es un procedimiento que se aplica de forma rutinaria para la evaluación de alimentos. También se ha empleado para predecir el consumo voluntario de alimentos *in vivo* (Blümmel y Becker 1997 y Blümmel *et al.* 1997, 2005). La técnica de producción de gas es un sistema *in vitro* en lote batch, en el cual se van acumulando los productos de la fermentación. Normalmente, para la implementación de esta técnica se incuban cantidades iguales de materia seca (MS) o materia orgánica (MO) de los tratamientos a comparar. Los indicadores que se miden se expresan por unidad de MS o MO incubada.

Sin embargo, nunca se ha intentado simular diferentes niveles de consumo a partir de la incubación de diferentes cantidades de sustratos, además de evaluar su efecto en los indicadores de la fermentación *in vitro* que normalmente se miden. Para simular diferentes niveles de consumo en este sistema *in vitro* habría que incubar las diferentes cantidades de las dietas que se quieren evaluar, de forma que las cantidades de sustrato a fermentar sean un reflejo de los niveles de consumo a simular. Posteriormente se expresan los indicadores medidos en unidades absolutas, y no por unidad de MS o MO incubada, como se hace normalmente.

Para alcanzar nuevos avances en las investigaciones son necesarios estudios que utilicen múltiples metodologías de investigación para abordar sistemas complejos y medir múltiples variables (McNamara *et al.* 2016). Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica de producción de gas *in vitro*, como método para predecir las relaciones que existen entre el nivel de consumo simulado (NCS) e indicadores de la fermentación, cuando se representaron varias situaciones prácticas de alimentación de animales en un sistema de estabulación nocturna.

Materiales y Métodos

Procedimiento experimental. Para diseñar los NCS a evaluar *in vitro*, se partió de un grupo de supuestos. Se estableció que el tratamiento control era la dieta que cubría los requerimientos de MS de animales machos en fase de preceba, con peso vivo promedio de 270 kg (PV), que hacen un consumo voluntario de 5.9 kg de MS, el 2.2 % de su PV (Martín 1981). La dieta control estaría conformada por tres elementos: 1.0 kg de harina de maíz (25 % del total del requerimiento de MS), 10 g de harina de caña de azúcar por kg de peso vivo de los animales

animals (40 % of the total DM requirement) and the rest grasses from a mixture of grasses and herbaceous legumes (45 % of the total DM requirement). Maintaining the proportions obtained from each element of the diet, the mixture was constituted to evaluate *in vitro* for the control treatment. These elements were mixed on dry basis, after drying and grinding. In the same way, three other diets were formed, with the difference that in these the amount of DM provided by the maize meal and the grasses mixture was maintained in absolute quantities, while the amount of sugarcane meal included in the diet varied (the equivalent to 0; 6.0 and 20.0 g kg⁻¹ LW).

Table 1 shows the final composition of the diets and the different simulated intake levels in the *in vitro* system.

The amounts referred for each food are those that

(40 % del total del requerimiento de MS) y el resto pastos de una mezcla de gramíneas y leguminosas herbáceas (45 % del total del requerimiento de MS). Manteniendo las proporciones obtenidas de cada elemento de la dieta, se conformó la mezcla a evaluar *in vitro* para el tratamiento control. Estos elementos se mezclaron en base seca, después de secados y molidos. De la misma forma, se conformaron otras tres dietas, con la diferencia que en estas se mantuvo en cantidades absolutas la cantidad de MS que aportaba la harina de maíz y la mezcla de pastos, mientras varió la cantidad de harina de caña de azúcar incluida en la dieta (el equivalente a 0; 6.0 y 20.0 g kg⁻¹ PV).

En la tabla 1 se muestra la composición final de las dietas y los diferentes niveles de consumo simulados en el sistema *in vitro*.

Table 1. Treatments evaluated to generate *in vitro* different intake levels

Indicator	SIL			
	1.9 % LW	2.1 % LW	2.2 % LW†	2.5 % LW
Grass (mg DM)	710.0	710.0	710.0	710.0
Maize (mg DM)	155.0	155.0	155.0	155.0
Cane meal (mg DM)	0	80.0	135.0	270.0
Cane meal (g DM kg ⁻¹ LW)	0	6.0	10.0	20.0
Total DM incubated <i>in vitro</i> (mg bottle ⁻¹)	865.0	945.0	1000.0	1135.0

†Control treatment that corresponds with requirements proposed by Martín (1981)

were incubated in each glass bottle. The treatments without sugarcane meal and with 6 g kg⁻¹ LW simulated practical situations, in which the animals when being stabulated could not intake the amount of DM they demanded to cover their requirements, according to Martín (1981), when only consume 1.9 and 2.1 % of their live weight. The treatment with 20 g kg⁻¹ LW of sugarcane simulates a situation in which the animals are stabulated with quantities of sugarcane that enable them to intake above their requirements, if their ingestion capacity allows it, which it represents 2.5 % of its live weight.

All the plant material was collected at the end of the dry season, in the experimental areas of the cattle grazing farm "Cebadero Ayala" of the Instituto de Ciencia Animal, with brown soil with carbonate (Hernández *et al.* 2015). The grass was collected from a paddock of 0.75 ha, with mixture of grasses (*Cynodon nlemfuensis* and natural grasses) and several herbaceous legumes with *Neonotonia wightii* and *Pueraria phaseoloides* as predominant species, according to 50 x 50 cm grassland sampling procedure. Sugarcane was collected in forage area and ground fresh in forage mill. In both cases, a single sampling was carried out and approximately 5 kg of each plant material was collected. The grass and fresh ground cane were dried at 60 °C for 72 h. Then, they were milled in hammer mill to 1 mm particle size.

Las cantidades referidas para cada alimento son las que se incubaron en cada botella de vidrio. Los tratamientos sin harina de caña de azúcar y con 6 g kg⁻¹ PV simulaban situaciones prácticas, en las que los animales al ser estabulados no podían consumir la cantidad de MS que demandaban para cubrir sus requerimientos, según Martín (1981), al solo consumir 1.9 y 2.1 % de su peso vivo. El tratamiento con 20 g kg⁻¹ PV de caña de azúcar simula una situación en la que los animales se estabulan con cantidades de caña de azúcar que les posibilitan consumir por encima de sus requerimientos, si su capacidad de ingestión se lo permite, lo que representa 2.5 % de su peso vivo.

Todo el material vegetal se recolectó a finales del período poco lluvioso, en las áreas experimentales de la finca de cebo bovina en pastoreo "Cebadero Ayala" del Instituto de Ciencia Animal, con suelo pardo con carbonato (Hernández *et al.* 2015). El pasto se recolectó de un cuartón de 0.75 ha, con mezcla de gramíneas (*Cynodon nlemfuensis* y pastos naturales) y varias leguminosas herbáceas con *Neonotonia wightii* y *Pueraria phaseoloides* como especies predominantes, según procedimiento de muestreo de pastizales con marco de 50 x 50 cm. La caña de azúcar se recolectó en área de forraje y se molió fresca en molino forrajero. En ambos casos, se realizó un único muestreo y se recolectaron aproximadamente 5 kg de cada material vegetal. El pasto y la caña fresca molida se secaron a

For the study of ruminal fermentation, the *in vitro* gas production technique was used (Theodorou *et al.* 1994). Four incubations were carried out (replications in time), four glass bottles per treatment and four control bottles without substrate were used. The gas production was measured every 3 h until the 24 hour.

Chemical analysis. For estimating the effect of SIL on nitrogen metabolism indicators, the nitrogen degradability was estimated according to the procedure proposed by Rodríguez *et al.* (2014), which is based on the determination of N-NH₃ and gas production. In this procedure, the *in vitro* degradability of nitrogen was estimated as the quotient between the solubilized nitrogen and the total nitrogen content of the treatments. In addition, the slope of the models generated by this method was taken as an index related to the synthesis efficiency of microbial biomass (SEMB, mg mL⁻¹). The NH₃ analyzes were carried out according to Chaney and Marbach (1962).

The DM and nitrogen content were determined to the substrates that constituted the experimental diet and to the wastes of the *in vitro* fermentation (AOAC 2016).

The neutral detergent fiber (NDF) was obtained by the procedure described by Van Soest *et al.* (1991). The DM degradability (DMDeg) was determined by gravimetry, as the difference between the incubated DM and the NDF content in the solid waste of the fermentation, divided by the DM incubated in each bottle (Blümmel *et al.* 1997).

To determine the concentration of the individual short chain fatty acids (SCFA) in the preserved samples, the vials were centrifuged at 14 200 x g (Centrifuge ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel) for 8 min. Later, they were analyzed by gas chromatography, according to the analytical conditions described by Rodríguez *et al.* (2014). The total SCFA were obtained by algebraic sum of the individual SCFA. The quotient of the concentration of acetic and propionic acid (Ac / Pp ratio) was calculated.

Experimental and statistical design. An experimental randomized block design was used. Four incubations or replications (blocks) were carried out. As an experimental unit, the average gas production of the bottles used per treatment was taken in each replication. The Pearson correlation index was used to determine the linear relation between SIL and indicators measured or estimated in the study. In addition, multiple linear regressions were performed to study the functional relation between the SIL (response variable) and the variables DMDeg, gas production, total SCFA and SEMB (predictor variables), and thus evaluate the possibilities of predicting the SIL from *in vitro* fermentation indicators.

To study the relative importance of the fermentation indicators in the prediction of the SIL, the partial determination coefficients (R²) were determined,

60 °C durante 72 h. Luego, se molieron en molino de martillo a tamaño de partícula de 1 mm.

Para el estudio de la fermentación ruminal se utilizó la técnica *in vitro* de producción de gas (Theodorou *et al.* 1994). Se realizaron cuatro incubaciones (réplicas en el tiempo), se utilizaron cuatro botellas de vidrio por tratamiento y 4 botellas blancas, sin sustrato. La producción de gas se midió cada 3 h hasta la hora 24.

Análisis químico. Para la estimación del efecto del NCS en los indicadores del metabolismo del nitrógeno se estimó la degradabilidad del nitrógeno según el procedimiento propuesto por Rodríguez *et al.* (2014), que se basa en la determinación del N-NH₃ y la producción de gas. En este procedimiento, la degradabilidad *in vitro* del nitrógeno se estimó como el cociente entre el nitrógeno solubilizado y el contenido de nitrógeno total de los tratamientos. Además, se tomó la pendiente de los modelos generados por este método, como un índice relacionado con la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (ESBM, mg mL⁻¹). Los análisis de NH₃ se realizaron según Chaney y Marbach (1962).

A los sustratos que conformaron la dieta experimental y a los residuos de la fermentación *in vitro*, se les determinó la MS y contenido de nitrógeno (AOAC 2016). La fibra detergente neutro (FDN) se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991). La degradabilidad de la MS (DegMS) se determinó por gravimetría, como la diferencia entre la MS incubada y el contenido de FDN en el residuo sólido de la fermentación, dividido por la MS incubada en cada botella (Blümmel *et al.* 1997).

Para determinar la concentración de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) individuales en las muestras preservadas, se centrifugaron los viales a 14 200 x g (Centrifuga ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel) durante 8 min. Posteriormente se analizaron por cromatografía de gases, de acuerdo con las condiciones analíticas descritas por Rodríguez *et al.* (2014). Los AGCC totales se obtuvieron por suma algebraica de los AGCC individuales. Se calculó el cociente de la concentración de ácido acético y propiónico (Relación Ac/Pp).

Diseño experimental y estadístico. Se empleó un diseño experimental de bloques al azar. Se realizaron cuatro incubaciones o réplicas (bloques). Como unidad experimental se tomó la media de producción de gas de las botellas empleadas por tratamiento en cada réplica. Se utilizó el índice de correlación de Pearson para determinar la relación lineal entre NCS e indicadores medidos o estimados en el estudio. Además, se realizaron regresiones lineales múltiples para estudiar la relación funcional entre el NCS (variable respuesta) y las variables DegMS, producción de gas, AGCC total y ESBM (variables predictoras), y de esa forma evaluar las posibilidades de predecir los NCS a partir de indicadores de la fermentación *in vitro*.

Para estudiar la importancia relativa de los indicadores de la fermentación en la predicción de los NCS, se

given that R^2 is a measure of the predictive capacity of the obtained model and partial R^2 is a measure of the predictive capacity of each variable included in the model. For this, from the analysis of variance of squares sum Type I (sum of sequential squares) the partial R^2 were estimated, as the quotient of the squared sum of each predictive variable and the sum of total squares.

In all cases, the statistical package InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2010) was used.

Results and Discussion

The results for the variables under study were previously published (Rodríguez *et al.* 2016). These were corroborated with those of an *in vivo* study, in which the effect of the voluntary intake level on the average daily weight gain of animals was evaluated, with weights at the beginning of the experiment similar to those assumed in this study (Iraola *et al.* 2016).

Table 2 shows the results of the Pearson correlation analysis between SIL and fermentation indicators. There was a high positive correlation between SIL and gas production ($r = 0.811$, $P < 0.001$). When simulating the increase in SIL from an increase in the amount of substrate incubated in the *in vitro* system, it was expected to increase the gas production expressed in mL, and not in mL per unit of incubated substrate. Similarly, high positive correlation was observed between SIL and acetic acid production ($r = 0.833$), butyric acid ($r = 0.810$) and total SCFA ($r = 0.761$) ($P < 0.05$). In an incubation time of 24 h, all the soluble cellular substrate must have been fermented, the increase in gas production and total SCFA could be associated to the increasing amounts of incubated cane meal, which increased the availability of sugars of easy fermentation for microorganisms.

The positive correlation of the SIL with the gas production and SCFA corresponds to the directly proportional relation that exists between the *in vitro* gas production and that of SCFA production (Getachew *et al.* 2002, 2004). However, the increase in the SIL was not correlated with the acetic / propionic ratio ($r = -0.308$, $P > 0.05$), because all the treatments were fitted to an acetic fermentation pattern and the substrate used to simulate the intake (sugarcane) is also a fibrous food with this type of fermentation pattern.

There was a high negative correlation between SIL and the DM degradability ($r = -0.732$) and nitrogen ($r = -0.921$) ($P < 0.001$). However, Van Soest *et al.* (1978), when determining the *in vitro* degradability of 187 forages of known voluntary intake, they observed that the intake and *in vitro* digestibility showed a positive correlation and its highest correlation coefficient was recorded at 6 h of incubation, while the degradability at 48 h, it was only able to explain 20 % of the variability of voluntary dry matter intake.

In this study, the decrease in the degradability by

determinaron los coeficientes de determinación (R^2) parcial, dado que R^2 es una medida de la capacidad predictora del modelo obtenido y R^2 parcial es una medida de la capacidad predictora de cada variable incluida en el modelo. Para ello, a partir del análisis de varianza de suma de cuadrados Tipo I (suma de cuadrados secuenciales) se estimaron los R^2 parcial, como el cociente de la suma de cuadrado de cada variable predictora y la suma de cuadrados total.

En todos los casos se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2010).

Resultados y Discusión

Los resultados para las variables en estudio se publicaron previamente (Rodríguez *et al.* 2016). Estos fueron corroborados con los de un estudio *in vivo*, en el que se evaluó el efecto del nivel de consumo voluntario en la ganancia de peso media diaria de animales, con pesos al inicio del experimento similares a los asumidos en este trabajo (Iraola *et al.* 2016).

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de correlación de Pearson entre NCS e indicadores de la fermentación. Hubo correlación positiva alta entre NCS y producción de gas ($r=0.811$, $P < 0.001$). Al simular el incremento en NCS a partir de un aumento en la cantidad de sustrato incubado en el sistema *in vitro*, era de esperar que aumentara la producción de gas expresada en mL, y no en mL por unidad de sustrato incubado. De igual forma, se observó correlación positiva alta entre NCS y producción de ácido acético ($r=0.833$), ácido butírico ($r=0.810$) y AGCC totales ($r=0.761$) ($P < 0.05$). En un tiempo de incubación de 24 h, todo el sustrato celular soluble se debe haber fermentado, el incremento en producción de gas y AGCC totales se podría asociar a las cantidades crecientes de harina de caña incubadas, lo que aumentó la disponibilidad de azúcares de fácil fermentación para los microorganismos.

La correlación positiva de los NCS con las producciones de gas y AGCC se corresponde con la relación directamente proporcional que existe entre la producción de gas *in vitro* y la de AGCC (Getachew *et al.* 2002, 2004). Sin embargo, el incremento en el NCS no estuvo correlacionado con la relación acético/propiónico ($r=-0.308$, $P > 0.05$), debido a que todos los tratamientos se ajustaron a un patrón de fermentación de tipo acético y el sustrato utilizado para simular el consumo (caña de azúcar) es también un alimento fibroso con este tipo de patrón de fermentación.

Hubo correlación negativa alta entre NCS y la degradabilidad de la MS ($r=-0.732$) y del nitrógeno ($r=-0.921$) ($P < 0.001$). Sin embargo, Van Soest *et al.* (1978), al determinar la degradabilidad *in vitro* de 187 forrajes de consumo voluntario conocido, observaron que el consumo y la digestibilidad *in vitro* mostraba una correlación positiva y su mayor coeficiente de correlación se registró a las 6 h de incubación, mientras que la degradabilidad a las 48 h solo era capaz de

Table 2. Pearson correlation between the SIL and indicators of *in vitro* fermentation (gas production [GasP], individual and total SCFA, Relation Ac/Pp, DM degradability [DM .Deg] and of nitrogen [N.Deg], SEMB and NH₃).

	SIL	GasP	Acetic	Propionic	Butyric	Total SCFA	Relation Ac/Pp	DM Deg.	N Deg.	SEMB	NH ₃
SIL	1.000	P<0.001	P<0.001	0.016	P<0.001	P<0.001	0.246	0.001	P<0.001	P<0.001	0.670
GasP	0.811	1.000	0.006	0.087	0.009	0.016	0.451	0.002	P<0.001	P<0.001	0.786
Acetic	0.833	0.657	1.000	P<0.001	P<0.001	P<0.001	0.005	-0.365	0.016	0.012	0.575
Propionic	0.591	0.442	0.892	1.000	P<0.001	P<0.001	P<0.001	-0.108	0.386	0.304	0.682
Butyric	0.810	0.631	0.976	0.950	1.000	P<0.001	P<0.001	-0.348	0.038	0.025	0.630
Total SCFA	0.761	0.590	0.981	0.962	0.994	1.000	P<0.001	-0.277	0.070	0.052	0.612
Rel. Ac/Pp	-0.308	-0.203	-0.669	-0.933	-0.784	-0.799	1.000	-0.114	0.746	0.903	0.819
DM Deg	-0.732	-0.708	0.164	0.691	0.186	0.299	0.675	1.000	P<0.001	P<0.001	0.670
N Deg	-0.921	-0.765	-0.590	-0.233	-0.523	-0.464	-0.088	0.818	1.000	0.000	0.093
SEMB	0.938	0.776	0.608	0.274	0.557	0.493	0.033	-0.827	-1.000	1.000	-0.089
NH ₃	-0.115	-0.074	-0.152	-0.111	-0.131	-0.137	0.062	0.115	0.733	0.743	1.000

increasing the SIL was due to the fact that the sugarcane meal was used to increase the amount of substrate to be fermented.

This food is of lower degradability than the other two substrates used (grasses and maize meal), so that the degradability of the total diet decreased as the inclusion level of cane meal increased. However,

explicar 20 % de la variabilidad del consumo voluntario de materia seca.

En este estudio, la disminución de la degradabilidad al incrementar el NCS se debió a que se utilizó la harina de caña de azúcar para incrementar la cantidad de sustrato a fermentar. Este alimento es de menor degradabilidad que los otros dos sustratos utilizados (pastos y harina

if a supplement with better digestibility than the base diet had been used to simulate an increase in the intake level, the correlation between the SIL and degradability could have been expected to be positive (Reis *et al.* 2016).

The SIL also showed a high positive correlation with SEMB ($r = 0.938$, $P < 0.001$), estimated as the slope (mg mL^{-1}) of the used model, when the treatments were incubated, alone or with 500 mg of maize starch. The increase of this indicator with the SIL increase does not correspond with that observed by Blümmel and Lebzien (2001), who did not report a significant relation between the *in vivo* voluntary intake of DM and the *in vitro* synthesis efficiency. However, these authors also recognize that there is much variation in the estimation of the efficiency of microbial synthesis, due, to the lack of laboratory techniques that allow measuring the microbial efficiency in a simple and exact way.

In this regard, it is known that the *in vivo* synthesis efficiency of microbial biomass is higher for diets with more available nitrogen content per unit of fermented organic matter (Blümmel and Lebzien 2001). However, when using the sugarcane meal to increase the SIL, its low protein contribution decreases the nitrogen content of the total diet, but the obtained results show that the efficiency of microbial synthesis showed positive correlation.

There was low negative correlation between the SIL and the NH_3 concentration ($r = -0.115$, $P > 0.05$). This low correlation could be due to the characteristics of the incubation solution used, which was designed to guarantee the N presence in the medium, so that it was not a limiting factor. This suggests that in future studies should also be evaluated incubation media poor in nitrogen, to avoid this problem.

Regarding the Pearson correlation coefficients between the different fermentation indicators, the high correlation between the gas production and DM degradability coincides with that obtained by Getachew *et al.* (1998) for these variables. However, these authors found that this correlation was positive. The fact that this relation was negative was due to the use of sugarcane to increase intake levels. Therefore, as the SIL increased, the degradability decreased, but the gas production also increased because the proportion of easily fermentable carbohydrates increased. In this regard, Getachew *et al.* (2004) observed that there was a positive correlation between the level of non-fibrous carbohydrates and the indicators of gas production at 6, 24 and 48 h of incubation, as well as with the potential kinetic parameter of *in vitro* gas production. The correlation coefficient between gas production and total SCFA was much lower than that reported by Getachew *et al.* (2002, 2004).

Table 3 shows multiple linear regression equations,

de maíz), por lo que la degradabilidad de la dieta total disminuyó en la medida que el nivel de inclusión de la harina de caña se incrementó. Sin embargo, si para simular incremento del nivel de consumo se hubiera empleado un suplemento de mejor digestibilidad que la dieta base, se podría haber esperado que la correlación entre el NCS y la degradabilidad fuera positiva (Reis *et al.* 2016).

El NCS también mostró alta correlación positiva con ESBM ($r = 0.938$; $P < 0.001$), estimada como la pendiente (mg mL^{-1}) del modelo utilizado, cuando se incubaron los tratamientos, solos o con 500 mg de almidón de maíz. El incremento de este indicador con el incremento del NCS no se corresponde con lo observado por Blümmel y Lebzien (2001), quienes no informaron relación significativa entre el consumo voluntario *in vivo* de MS y la eficiencia de síntesis *in vitro*. Sin embargo, estos autores también reconocen que existe mucha variación en la estimación de la eficiencia de síntesis microbiana, debido, en gran medida, a la falta de técnicas de laboratorio que permitan medir la eficiencia microbiana de una forma sencilla y exacta.

Al respecto, se conoce que la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana *in vivo* es mayor para las dietas con más contenido de nitrógeno disponible por unidad de materia orgánica fermentada (Blümmel y Lebzien 2001). Sin embargo, al utilizar la harina de caña de azúcar para incrementar los NCS, su baja contribución en proteínas hace que disminuya el contenido de nitrógeno de la dieta total, pero los resultados obtenidos evidencian que la eficiencia de síntesis microbiana demostró correlación positiva.

Hubo baja correlación negativa entre el NCS y la concentración de NH_3 ($r = -0.115$, $P > 0.05$). Esta baja correlación pudo estar dada por las propias características de la solución de incubación utilizada, que se diseñó para garantizar la presencia de N en el medio, de manera que no fuera un factor limitante. Esto sugiere que en futuros estudios se debe de evaluar también medios de incubación pobres en nitrógeno, que permitan evitar este inconveniente.

En cuanto a los coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes indicadores de la fermentación, la alta correlación entre la producción de gas y la degradabilidad de la MS coincide con lo obtenido por Getachew *et al.* (1998) para estas variables. Sin embargo, estos autores obtuvieron que dicha correlación fue positiva. El hecho de que dicha relación fuera negativa, se debió al uso de la caña de azúcar para incrementar los niveles de consumo. Por tanto, en la medida que aumentó el NCS disminuyó la degradabilidad, pero también se incrementó la producción de gas porque aumentó la proporción de carbohidratos fácilmente fermentables. Al respecto, Getachew *et al.* (2004) observaron que hubo correlación positiva entre el nivel de carbohidratos no fibrosos y los indicadores de producción de gas a las 6, 24 y 48 h de incubación, así como con el parámetro cinético potencial de producción de gas *in vitro*. El coeficiente de correlación entre la producción de gas y los AGCC totales fue mucho menor

in which some of the fermentation indicators were used [DM degradability (%), gas production (mL), total SCFA (mmol L⁻¹) and SEMB (mg mL⁻¹)] as predictor variables of the SIL. These predictor variables were selected among those that showed the highest Pearson correlation with the SIL.

The determination coefficients improved when

al informado por Getachew *et al.* (2002, 2004).

En la tabla 3 se muestran ecuaciones de regresión lineal múltiple, en las que se utilizaron algunos de los indicadores de la fermentación [degradabilidad de la MS (%), producción de gas (mL), AGCC total (mmol L⁻¹) y ESBM (mg mL⁻¹)] como variables predictoras del NCS. Estas variables predictoras se seleccionaron entre las que

Table 3. Multiple linear regressions between the SIL (% LW) and indicators of *in vitro* fermentation [DM degradability (%), gas production (mL), total SCFA (mmol L⁻¹) and SEMB (mg mL⁻¹)].

Model†	Predictor variables	R ²	P
SIL= 0.773 (1.0511) -0.022 (0.0149)*DMDeg+ 0.016 (0.0058)*GASP	DM Deg+GasP	0.7074	0.0003
	DM Deg*	0.5356	0.0003
	GasP*	0.1718	0.0161
SIL= -1.445 (0.8700)- 0.033 (0.0102)*DMDeg+ 0.005 (0.0047)*GASP+ 0.037 (0.0087)* total SCFA	DM Deg+GasP+ total SCFA	0.8823	<0.0001
	DM Deg*	0.5356	<0.0001
	GasP*	0.1718	0.0013
SIL= 0.727 (0.1356)- 0.0018 (0.0017)* DM Deg+ 0.027 (0.0011)*SCFA+ 0.238 (0.0090)*SEMB	Total SCFA*	0.1749	0.0012
	DM Deg+ total SCFA+SEMB	0.9978	<0.0001
	DM Deg*	0.5356	<0.0001
SIL= -2.9217 (0.9724)+ 0.015 (0.0044)*GASP+ 0.030 (0.0111)* total SCFA	Total SCFA*	0.3377	<0.0001
	SEMB*	0.1245	<0.0001
	GASP+ total SCFA	0.7798	0.0001
SIL= 0.753 (0.1524)+ 0.0001 (0.0007)*GASP+ 0.027 (0.0012)* total SCFA+ 0.2450 (0,0074)* SEMB	GasP*	0.6573	<0.0001
	Total SCFA*	0.1225	0.0185
	GasP+ total SCFA +SEMB	0.9976	<0.0001
	GasP*	0.6573	<0.0001
	Total SCFA*	0.1225	<0.0001
	SEMB*	0.2177	<0.0001

†the standard error of the variables is shown in parentheses

*Partial R²

increasing from two to three predictor variables included in the model. When including the DM degradability as a predictor variable, it showed the highest values of partial R² and, therefore, it was the variable that explained the higher proportion of the total variability of the SIL data. When excluding it, the gas production contributed the highest partial R², explaining 65.7 % of the variability. Although gas production reflects the amount of substrate used for the SCFA production, it is also known that it is positively related to intake (Blümmel and Ørskov 1993).

When performing multiple linear regressions, Blümmel and Becker (1997) observed a close relation between the parameters of *in vitro* gas production and the *in vivo* voluntary intake of food. Likewise, Blümmel *et al.* (2005) stated that data of gas production when complemented with determinations of substratum degradability, improved the possibilities of predicting voluntary intake of food.

On the other hand, when other predictor variables were included, the R² of the SIL prediction model improved, although its partial R² depended on whether they were associated with the DM degradability

mostraron mayor correlación de Pearson con el NCS.

Los coeficientes de determinación mejoraron al incrementar de dos a tres variables predictoras incluidas en el modelo. Al incluir la degradabilidad de la MS como variable predictora, esta mostró los mayores valores de R² parcial y por tanto, fue la variable que explicó la mayor proporción de la variabilidad total de los datos de NCS. Al excluirla, la producción de gas aportó la mayor R² parcial, al explicar 65.7 % de la variabilidad. Aunque la producción de gas refleja la cantidad de sustrato utilizado para la producción de AGCC, también se conoce que se relaciona también positivamente con el consumo (Blümmel y Ørskov 1993).

Al realizar regresiones lineales múltiples, Blümmel y Becker (1997) observaron estrecha relación entre los parámetros de la producción de gas *in vitro* y el consumo voluntario *in vivo* de alimentos. A su vez, Blümmel *et al.* (2005) plantearon que los datos de producción de gas al complementarse con determinaciones de degradabilidad del sustrato mejoraban las posibilidades de predicción del consumo voluntario de alimentos.

Por su parte, al incluir otras variables predictoras mejoró la R² del modelo de predicción del NCS, aunque

variable or not. The predictor variables total SCFA and SEMB, when associated with the DM degradability variable, explained 17.2 and 12.5 % of the total variability; while associating them with gas production at 24 h explained 33.8 and 21.8 %, respectively.

The gas production technique has been used as a measure of rumen degradation of food and as an indicator of digestible DM intake. In fact, the fractional degradation rate has been a means to predict the voluntary intake of ruminants (López *et al.* 1998). However, in the efforts made to relate the rates of *in vitro* digestion with DM intake, the correlations have been low, because the variables clearly important in regulating the intake such as the physiological state, the production level and environmental conditions are not taken into account (Pell *et al.* 1997). Probably this same thing happens in the case of the predictor variables total SCFA and SEMB.

This is a preliminary study where it was tried to simulate different voluntary intake levels by *in vitro* incubation of different amounts of substrates of a diet based on grasses and a supplementation with maize meal.

Although the Pearson correlation indexes and the multiple linear regression models show that the measured variables could be used to predict the intake levels, other *in vitro* studies are required in which the intake levels are simulated with the inclusion of supplements equal or more degradable than the base diet, and *in vivo* studies to establish correlations between these and *in vitro* results.

It is concluded that the Pearson correlations and the multiple linear regressions allow suggesting that can be predicted the SIL which simulated *in vitro*, from DM degradability data and gas production, at 24 h of incubation, while the inclusion of total SCFA and ESBM as predictor variables increased the determination coefficient of the linear models obtained.

Acknowledgments

Thanks to Dr. Yoleisy García, from the Instituto de Ciencia Animal, for her help in the understanding and determination of the partial contribution of the predictor variables to the determination coefficient of the multiple linear models.

su R^2 parcial dependió de si se asociaron con la variable degradabilidad de la MS o no. Las variables predictoras AGCC totales y ESBM, al asociarse con la variable degradabilidad de la MS, explicaron el 17.2 y 12.5 % de la variabilidad total; mientras que al asociarlas con la producción de gas a las 24 h explicaron el 33.8 y 21.8 %, respectivamente.

La técnica de producción de gas se ha usado como una medida de la degradación ruminal de los alimentos y como indicador del consumo de MS digestible. De hecho, la tasa fraccional de degradación ha sido un medio para predecir el consumo voluntario de rumiantes (López *et al.* 1998). No obstante, en los intentos realizados para relacionar las tasas de digestión *in vitro* con el consumo de MS, las correlaciones han sido bajas, porque las variables claramente importantes en regular el consumo tales como el estado fisiológico, el nivel de producción y las condiciones ambientales no son tenidas en cuenta (Pell *et al.* 1997). Probablemente esto mismo suceda en el caso de las variables predictoras AGCC totales y ESBM.

Este es un estudio preliminar donde se pretendió simular diferentes niveles de consumo voluntario mediante la incubación *in vitro* de diferentes cantidades de sustratos de una dieta basada en base de pastos y una suplementación con harina de maíz. Aunque los índices de correlación de Pearson y los modelos de regresión lineal múltiple indican que las variables medidas se podrían utilizar para predecir los niveles de consumo, se requieren otros estudios *in vitro* en los que los niveles de consumo se simulen con la inclusión de suplementos igual o más degradables que la dieta base, y estudios *in vivo* para poder establecer correlaciones entre estos y los resultados *in vitro*.

Se concluye que las correlaciones de Pearson y las regresiones lineales múltiples permiten sugerir que se pueden predecir los NCS que se simularon *in vitro*, a partir de los datos de degradabilidad de la MS y producción de gas, a las 24 h de incubación, mientras que la inclusión de AGCC totales y ESBM como variables predictoras incrementó el coeficiente de determinación de los modelos lineales obtenidos.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Yoleisy García, del Instituto de Ciencia Animal, por su ayuda en la comprensión y determinación de la contribución parcial de las variables predictoras al coeficiente de determinación de los modelos lineales múltiples.

References

- AOAC, G. W. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed., Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5, Available: <<http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>>, [Consulted: September 22, 2016].
- Blümmel, M. & Becker, K. 1997. "The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibers as described by *in vitro* gas production and their relationship to voluntary feed intake". British Journal of Nutrition, 77(5): 757-768, ISSN: 1475-2662, 0007-1145, DOI: 10.1079/BJN19970073.
- Blümmel, M., Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Nshalai, I., Umunna, N. N., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2005. "Prediction of forage intake using *in vitro* gas production methods: Comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system". Animal Feed Science and Technology, 123-124(Part 1): 517-526, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.04.040.

- Blümmel, M. & Lebzien, P. 2001. "Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by *in vitro* techniques". *Livestock Production Science*, 68(2): 107–117, ISSN: 0301-6226, DOI: 10.1016/S0301-6226(00)00241-4.
- Blümmel, M. & Ørskov, E. R. 1993. "Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle". *Animal Feed Science and Technology*, 40(2): 109–119, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(93)90150-I.
- Blümmel, M., Steingäß, H. & Becker, K. 1997. "The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages". *British Journal of Nutrition*, 77(6): 911–921, ISSN: 1475-2662, 0007-1145, DOI: 10.1079/BJN19970089.
- Chaney, A. L. & Marbach, E. P. 1962. "Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia". *Clinical Chemistry*, 8(2): 130–132, ISSN: 0009-9147, 1530-8561.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2010. InfoStat. version 2010, [Windows], Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 1998. "The *in vitro* gas coupled with ammonia measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1): 87–95, ISSN: 1097-0010, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<87::AID-JSFA7>3.0.CO;2-X.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2002. "Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production". *The Journal of Agricultural Science*, 139(3): 341–352, ISSN: 1469-5146, 0021-8596, DOI: 10.1017/S0021859602002393.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J. & Taylor, S. J. 2004. "Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds". *Animal Feed Science and Technology*, 111(1): 57–71, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(03)00217-7.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Iraola, J., García, Y. & Hernández, J. L. 2016. "Bovine males in restricted pastures supplemented with sugar cane and corn". *Revista Avances en Investigación Agropecuaria*, 20(1): 43–48, ISSN: 0188-7890.
- Iraola, J., Muñoz, E., García, Y., García, Y., Hernández, J. L., Tuero, O. & Moreira, O. 2013. "Feeding behavior of male cattle under restricted grazing, supplemented with distiller maize grains during the dry period". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(3): 255–260, ISSN: 2079-3480.
- López, S., Carro, M. D., González, J. S. & Ovejero, F. J. 1998. "Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen". *Animal Feed Science and Technology*, 73(1): 99–113, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(98)00129-1.
- Martín, P. C. 1981. Metodología de balance alimentario y formulario de raciones para el ganado vacuno en Nicaragua. Managua, Nicaragua: MIDINRA, 177 p.
- McNamara, J. P., Hanigan, M. D. & White, R. R. 2016. "Invited review: Experimental design, data reporting, and sharing in support of animal systems modeling research". *Journal of Dairy Science*, 99(12): 9355–9371, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2015-10303.
- Pell, A. N., Doane, P. H. & Schofield, P. 1997. "*In vitro* digestibility and gas production". In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, pp. 109–132.
- Pulina, G., Avondo, M., Molle, G., Francesconi, A. H. D., Atzori, A. S. & Cannas, A. 2013. "Models for estimating feed intake in small ruminants". *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(9): 675–690, ISSN: 1516-3598, DOI: 10.1590/S1516-35982013000900010.
- Reis, W. L. S., Detmann, E., Batista, E. D., Rufino, L. M. A., Gomes, D. I., Bento, C. B. P., Mantovani, H. C. & Valadares Filho, S. C. 2016. "Effects of ruminal and post-ruminal protein supplementation in cattle fed tropical forages on insoluble fiber degradation, activity of fibrolytic enzymes, and the ruminal microbial community profile". *Animal Feed Science and Technology*, 218(Supplement C): 1–16, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeeds.2016.05.001.
- Rodríguez, R., González, N., Ramírez, A., Gómez, S., Moreira, O., Sarduy, L. & Medina, Y. 2014. "Tannins of tropical shrub-like legumes: their effect on protein protection of soybean meal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(3): 247–252, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Iraola, J., Galindo, J., Gómez, S. & Moreira, O. 2016. "Simulación *in vitro* del efecto del nivel de consumo de caña de azúcar en la fermentación de una dieta para rumiantes a base de gramíneas y leguminosas rastreras". In: VII Conferencia Científica Internacional sobre Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad, Cayo Santa María, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, ISBN: 978-959-312-174-3.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. "A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds". *Animal Feed Science and Technology*, 48(3): 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Van Soest, P. J., Mertens, D. R. & Deinum, B. 1978. "Preharvest Factors Influencing Quality of Conserved Forage". *Journal of Animal Science*, 47(3): 712–720, ISSN: 0021-8812, DOI: 10.2527/jas1978.473712x.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.