INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN BALSA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DEL ORUJO GRASO DE ACEITUNA

Marcos, C.N.[1], de Blas, C.[1], Rodríguez, C.A.[1], González, J.[1], Fernández, R.[2], Molina-Alcaide, E.[3] y Carro, M.D.[1]
[1] Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España. [2] SACYR Industrial S.A., Paseo de la Castellana, 83-85, 28046 Madrid, España. [3] Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada. España.
navarro-88@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

España es el mayor productor mundial de aceite de oliva, cuya extracción genera un residuo denominado alperujo y que tiene una producción anual nacional de casi 4 millones de toneladas (Barres, 2013). Por ello, es necesario buscar alternativas para la reutilización de este subproducto. La alternativa de uso en la alimentación animal representa una opción muy interesante, ya que contribuiría no solo a reciclar el subproducto sino también a reducir los costes de alimentación, contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas ganaderos, y a reducir la huella de carbono de los productos animales debido a su producción regional/local (Del Prado *et al*., 2013). Además, la inclusión del alperujo en la dieta de rumiantes puede tener un valor añadido debido a su contenido en fenoles y ácidos grasos específicos, reduciendo las emisiones de metano y mejorando el perfil de ácidos grasos de los productos animales (Molina-Alcaide *et al*., 2010). El alperujo suele permanecer durante un tiempo variable (0-8 meses) en balsas de almacenamiento antes de su procesado, lo que puede provocar cambios en su composición y valor nutritivo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar las variaciones temporales, producidas durante el almacenamiento, en la composición y fermentación ruminal *in vitro* de muestras de orujo graso de aceituna.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de orujo graso desecadas y peletizadas obtenidas de la misma balsa, a intervalos de un mes, durante seis meses consecutivos (diciembre de 2015 - mayo de 2016). Las muestras se molieron (1 mm) y se analizó su contenido en materia seca y materia orgánica según la AOAC (1999). El contenido en energía bruta (EB) se determinó en una bomba calorimétrica PARR 1356 (Parr Instrument Company, Moline, IL, Estados Unidos), el contenido en N se analizó por el método de combustión Dumas y el contenido en extracto etéreo (EE) se midió mediante extracción con éter de petróleo. La concentración en fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) se analizó siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991) y el contenido en azúcares se determinó por la técnica de la Antrona (Yemm y Willis, 1954).
Las incubaciones *in vitro* se llevaron a cabo en viales de vidrio (60 ml) en los que se pesaron 200 mg de materia seca de cada muestra. El líquido ruminal se obtuvo de cuatro ovejas, que recibieron dos veces al dia heno de gramíneas y concentrado en proporción 2:1. El contenido ruminal extraido de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa y se trasladó inmediatamente al laboratorio. El fluido ruminal se mezcló con medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970) en una relación 1:4 (vol/vol), a 39 °C bajo gaseado continuo con CO_2, y se dosificaron 20 ml de la mezcla en cada vial mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31). Los viales se cerraron herméticamente y se incubaron a 39 ºC durante 24 horas. Adicionalmente, se incluyeron viales sin sustrato para corregir para la producción de gas procedente del inóculo. Las incubaciones se realizaron utilizando el inóculo de cada oveja por separado, para obtener cuatro réplicas por tratamiento. Al finalizar la incubación, en cada vial se midió el volumen de gas y el pH y se tomaron muestras para el análisis de la concentración en $N\text{-}NH_3$ y ácidos grasos volátiles (AGV) siguiendo los procedimientos descritos por Martínez *et al.* (2010).
Los resultados *in vitro* se analizaron mediante un análisis de varianza, utilizando un modelo mixto con medidas repetidas, donde el tiempo de recogida se consideró como efecto fijo y el inóculo (oveja donante) como efecto aleatorio. Asimismo, se realizaron contrastes polinomiales para estudiar el efecto lineal del tiempo de almacenamiento de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido en materia orgánica, EE y EB de las muestras presentó pequeñas variaciones durante el almacenamiento (Tabla 1). Por el contrario, la concentración en azúcares disminuyó de forma acusada (desde 20,2 hasta 2,89%) con el tiempo y aumentó el contenido en FND (44,5 – 71,2%) y FAD (32,5 – 46,8%). El contenido en PB osciló entre 8,65 en diciembre y 10,3% en mayo, sin que se observaran variaciones claras debidas al tiempo de almacenamiento. En todas las muestras una alta proporción de la proteína estuvo ligada a la FAD (44 - 62%), lo que confirma resultados previos e indica una baja utilización de la proteína (Molina-Alcaide et al., 2003). Los valores de composición química estuvieron dentro del rango señalado por Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz (2008) en un trabajo de revisión.

***Tabla 1**. Composición química de muestras de orujo graso de aceituna recogidas a diferentes tiempos de almacenamiento en balsa*

	Tiempo de muestreo					
Item[1]	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
Materia seca[1]	92,4	89,8	90,6	88,8	92,1	86,2
Materia orgánica[2]	93,1	92,5	92,5	92,8	94,8	93,4
Fibra neutro detergente[2]	44,5	49,4	51,3	61,7	65,2	71,2
Fibra ácido detergente (FAD)[2]	32,5	36,5	36,6	43,8	45,3	46,8
Lignina[2]	17,2	19,1	18,2	20,9	20,4	20,9
Extracto etéreo[2]	10,4	11,8	8,60	11,8	10,3	10,0
Proteína bruta (PB)[2]	8,65	9,66	9,76	10,1	9,30	10,3
PB-FAD[2]	4,72	6,01	5,17	5,82	4,40	4,51
Azúcares[2]	20,2	10,6	8,02	3,34	3,30	2,89
Energía bruta[3]	21,7	21,9	21,5	22,0	22,0	22,8

[1] g/100 g materia fresca; [2] g/100 g materia seca; [3] MJ/kg MS

A medida que aumentó el tiempo de almacenamiento se observó un aumento lineal (P<0,001) en el pH final de los cultivos, así como una reducción (P<0,001) lineal en la producción de gas, AGV totales, acético, propiónico y butírico (Tabla 2).

***Tabla 2.** Efecto de la época de muestreo en los parámetros fermentativos* in vitro *de muestras de orujo graso de aceituna*

	Tiempo de muestreo							
Item	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	eem[1]	P =[2]
pH	6,78^{a}	6,87^{b}	6,90^{b}	6,97^{c}	7,04^{d}	7,08^{d}	0,01	<0,001
Gas (ml)	18,5^{d}	14,5^{c}	14,6^{c}	11,2^{b}	9,52^{a}	8,60^{a}	0,65	<0,001
AGV (µmol)								
Total	907^{e}	811^{d}	796^{d}	675^{c}	615^{b}	477^{a}	50,2	<0,001
Acético (Ac)	577^{e}	513^{d}	503^{d}	420^{c}	384^{b}	279^{a}	30,4	<0,001
Propiónico (Pr)	204^{e}	179^{d}	176^{d}	144^{c}	125^{b}	107^{a}	11,0	<0,001
Butírico	91,9^{e}	83,8^{de}	80,4^{cd}	73,5^{bc}	68,6^{b}	58,2^{a}	8,55	<0,001
Valérico	11,1	10,8	10,9	10,6	10,0	10,6	1,05	0,069
Isobutírico	8,20	8,46	8,56	9,27	8,85	7,68	0,95	0,858
Isovalérico	15,5	16,6	17,1	18,1	18,1	14,0	2,26	0,714
Ac/Pr (mol/mol)	2,87	2,89	2,88	2,91	3,06	2,60	0,14	0,219
N-NH_3 (mg/l)	217	199	202	229	238	201	27,1	0,591

[1] eem: error estándar de la media

[2] Efecto lineal del tiempo de muestreo

[a-e] Medias en la misma fila con diferentes superíndices son diferentes (P<0,05)

En comparación con la primera muestra (obtenida en diciembre), el almacenamiento durante tres meses en la balsa provocó una reducción del de la producción total de AGV del 12,2%, pero el almacenamiento durante seis meses aumentó esta reducción hasta el 47,4%. La reducción observada en la producción de gas y AGV al avanzar el tiempo de almacenamiento podría ser debida al menor contenido en sustancias fácilmente fermentables, como los azúcares, y al aumento proporcional del contenido en FND y FAD. Por el contrario, no se observó un efecto lineal del tiempo (P>0,05) en la producción de isobutírico e isovalérico, la relación acético/propiónico ni la concentración de N-NH_3. Estos resultados concuerdan con las menores variaciones en el contenido en proteína bruta observadas a lo largo del tiempo de almacenamiento y con la utilización de un medio de cultivo que aporta nitrógeno para los microorganismos ruminales.
Los resultados de este estudio indican que los orujos de aceituna con un mayor tiempo de almacenamiento tendrían un menor valor nutritivo para los animales rumiantes, por lo que sería aconsejable su procesado en las primeras fases.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

● AOAC.1999. Official Methods of Analysis. Ed. Association of Official Analytical Chemists. (16th ed. 5th rev.). Internacional. ● Barres T. 2013. *Producción y Consumo Sostenibles y Residuos Agrarios*. Ed. MAGRAMA, Madrid. ● Del Prado A. *et al.* 2013. Sci. Total Environm. 465: 156-165. • Goering. H. K., Van Soest. P. J. 1970. Agricultural Research Service-USDA. Washington. D.C. • Martínez, M.E. *et al.* 2010. Anim. Feed Sci. Tech. 158: 126–135. • Molina Alcaide, E. *et al.* 2003. Small Rum. Res. 49: 329–336. • Molina. E., Yáñez-Rúiz. D.R. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 247–264. • Molina-Alcaide, E. *et al.* 2010. J. Dairy Sci. 93: 2076–2087. • Van Soest, P.J. *et al.* 1991. J. Dairy Sci. 74: 3583–3597. • Yemm, E.W. Willis, A.J. 1954. Biochem. J. 57: 508-514.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos AGL2016-75322-C2-1-R y AGL2014-56653-C3-1-R, financiados por el MINECO. Nuestro agradecimiento al Dr. Fernando Bacha por su ayuda para conseguir las muestras utilizadas en este trabajo.

INFLUENCE OF STORAGE TIME ON CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* RUMINAL FERMENTATION OF CRUDE OLIVE CAKE

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the influence of storage time in the pond on chemical composition and *in vitro* ruminal fermentation of crude olive cake (COC). Samples of COC were obtained monthly from the same pond on six consecutive months (December 2015 - May 2016). *In vitro* incubations (24 h) were carried out with sheep rumen fluid to measure the main fermentation parameters. Organic matter (92.5 – 94.8%), ether extract (8.60 – 11.6%) and gross energy (21.5 – 22.8 MJ/kg) content were slightly variable. In contrast, there was a pronounced decrease in sugars concentration as storage time advanced (20.2 to 2.89%), as well as an increase in neutral detergent fibre (NDF; 44.5 – 71.2%) and acid detergent fibre (ADF; 32.5 – 46.8%). Crude protein content ranged from 8.65 to 10.3%, and a high proportion (44 – 62%) was linked to ADF. Increasing storage time linearly decreased (P<0.001) final pH in the *in vitro* cultures and the production of gas, total volatile fatty acids (VFA), acetate, propionate and butyrate. Compared with the sample from in December, the storage of COC for three months reduced total VFA production by 12.2%, but increasing storage time to six months resulted in a 47.4% reduction of total VFA, which was consistent with the decrease in the concentration of sugars, and the corresponding increase in NDF and ADF. There was no linear effect (P>0.05) of storage time on NH_3-N concentrations, production of minor VFA (isobutyrate, isovalerate) or acetate/propionate ratio. The results indicate that increasing storage time decreases the nutritive value of COC for ruminants.

Keywords: crude olive cake, storage time, chemical composition, *in vitro* ruminal fermentation