

## Nutritive value and *in vitro* caecal fermentation of forage meal of mulberry variety YU 62 for rabbits

### Valor nutritivo y fermentación cecal *in vitro* de la harina de forraje de morera variedad YU 62 para conejos

G.E. Vasallo, Lourdes Savón, L.E. Dihigo and J.G. Cairo

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

*Email: george@ica.co.cu*

The objective of this study was to determine the nutritional value and *in vitro* caecal fermentation in mulberry forage meal, variety YU 62, for rabbits. A completely random design was used, analyzing six times the samples of mulberry variety YU 62 forage meal with *Medicago sativa* (lucerne) as control. An *in vitro* simulation of digestive process in anatomical segments of stomach, duodenal and caecal gastrointestinal tract of rabbit was made. In stomach phase, high calcium content in mulberry raised the pH. In the duodenal phase, a lower pH with a suitable acid-base balance was obtained, which produced an increase in digestibility of crude protein ( $P < 0.0001$ ) in mulberry forage meal with value of 54.92 % vs 36.4% respectively of lucerne control. In the caecal phase, in mulberry meal, digestibility of dry matter was higher than the values found in lucerne influenced by the higher digestibility for NDF. This is due to its high content of hemicellulose in the cecum and has a favorable effect on the activity of the caecal microbiota that coincides with the increase of short-chain fatty acid mainly acetic and butyric with significant difference ( $P < 0.0001$ ) with lucerne. In addition, it should be noted that increasing short chain fatty acids lowers pH, tending to neutrality. It is suggested that mulberry forage meal variety YU 62 has a positive *in vitro* nutritive value, so that it could be used instead of lucerne as an alternative raw material in the formulation of diets for rabbit feeding.

Key words: *rabbit, mulberry, in vitro nutritional value*

The development of animal production systems, currently, demand to be more profitable. One of the alternatives to achieve this is the use of trees and shrubs of high nutritional quality and performance that are fibre sources, which may be key components in rabbit feeding, because they are involved in regulating digesta passage rate through the gastrointestinal tract and conducive to proper digestive function (Rebours *et al.* 2017).

Mulberry tree has good nutritional characteristics and biomass production of more than 15 tDM/ha/year. Knowledge of its digestibility is essential to propose dietary formulas that enable to establish parameters for inclusion in the diet for rabbits, and the use of the *in vitro* method allows to predict rapid and economically the nutritional value of feed and especially digestibility of nutrients in concentrates (Dihigo 2007).

It is also important to specify the values of caecal fermentation (short-chain fatty acids, pH and ammonia) which are indicators that reflect the activity of the caecal

El objetivo del presente trabajo fue determinar el valor nutritivo y la fermentación cecal *in vitro* en la harina de forraje de morera variedad YU 62 para conejos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado en el que se analizó por sextuplicado las muestras de harina de forraje de morera variedad YU 62 y *Medicago sativa* (alfalfa) como control. Se efectuó la simulación *in vitro* del proceso digestivo en los segmentos anatómicos del tracto gastrointestinal estomacal, duodenal y cecal del conejo. En la fase estomacal el alto tenor en calcio de la morera elevó el pH. En la fase duodenal se obtuvo un menor pH con un equilibrio ácido básico adecuado que produjo un incremento de la digestibilidad ( $P < 0.0001$ ) de proteína bruta de la harina de forraje de morera con valores de 54.92 % vs. 36.4 % con respecto al control con alfalfa. En la fase cecal, con la harina de morera, la digestibilidad de materia seca fue mayor que los valores encontrados en la alfalfa, influenciados por una mayor digestibilidad de fibra detergente neutra. Esto se debe a su alto contenido de hemicelulosa en el ciego y tiene un efecto favorable en la actividad de la microbiota del ciego que coincide con un incremento producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente el acético y el butírico, con diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) con la alfalfa. Además, se debe señalar que el aumento de los ácidos grasos de cadena corta disminuye el pH, con una tendencia a la neutralidad. Se sugiere que la harina de forraje de morera variedad YU 62 posee un valor nutritivo *in vitro* adecuado por lo que se podría utilizar, en vez de la alfalfa, como una materia prima alternativa para la formulación de dietas para conejos.

Palabras clave: *conejos, morera, valor nutricional in vitro*

El desarrollo de sistemas de producción animal, en la actualidad, exigen ser más rentables. Una de las alternativas para lograr esto es el uso de árboles y arbustos de alta calidad nutricional y rendimiento que son fuentes fibrosas que pueden constituir los componentes fundamentales en la alimentación del conejo, ya que intervienen en la regulación de la tasa de pasaje de la digesta a través del tracto gastrointestinal y propician un funcionamiento digestivo adecuado (Rebours *et al.* 2017).

La morera es una planta que posee buenas características nutricionales y producción de biomasa de más de 15 tMS/ha/año. El conocimiento de su digestibilidad, es fundamental para proponer fórmulas dietéticas que posibilitan establecer los indicadores para su inclusión en la dieta para conejos, y a través del método *in vitro* permite predecir de manera rápida y económica el valor nutritivo de los alimentos y en especial la digestibilidad de los nutrientes en los concentrados (Dihigo 2007).

De vital importancia es también precisar los valores de fermentación cecal (ácidos grasos de cadena corta, pH y amoníaco) que constituyen indicadores que reflejan

ecosystem, influenced by the nutrients in the diet, one of the most important factors (Knudsen, 2014). Therefore, it is important the use of caecal content in *in vitro* techniques.

According to the above, the objective of this study was to determine the nutritional value and *in vitro* caecal fermentation in mulberry forage meal, variety YU 62, for rabbits.

### Materials and Methods

The study was developed at the department of Bio-physiological Sciences, in the Instituto de Ciencia Animal, located at Carretera Central km 47 ½, San José de las Lajas, Mayabeque province.

*Preparation of forage feed source.* Mulberry forage (*Morus alba*) variety YU 62, from a hectare from Guayabal experimental unit, composed by three fields with two years of establishment in a red ferrallitic soil, was used.

In the agronomic management, chemical fertilization was applied with urea and organic-based organic matter and humus. The first cut was carried out at 12 months after sowing and later, 11 cuts up to July 2014, when the plant was obtained, after that with a cutting frequency every 50 days during the rainy season. Plant cutting was conducted at 50 cm high from the soil.

The sampling process was randomly carried out in three fields with two samples of fresh material per field, with a weight of 1 kg each. Components of edible biomass were cut, which included leaves and stems that were homogenized and woody stems were discarded. Later, drying was performed under the sun (36 hours).

Pellets of lucerne (*Medicago sativa*) were purchased from the Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Six bags of lucerne were sampled with taking 5 points per each bag until a sample collection of 2kg per bag.

All samples (lucerne and mulberry) were ground with a hammer mill of 4mm and sieved to 1mm for further laboratory analyses.

*Determination of the chemical composition.* Chemical composition was determined six times in samples of mulberry forage and lucerne as control. Dry matter (DM), organic matter (OM), ash and crude protein (CP) contents were determined according to the method of AOAC (2016). Cell wall fractions (NDF, ADF and ADL) were determined by Goering and Van Soest (1970). NDF and ADF were corrected for ash and performed using crucibles. Cellulose (Cel) and hemicellulose (Hec) were calculated by difference between ADF-ADL and NDF-ADF, respectively. Calcium (Ca) was analyzed by atomic absorption and phosphorous (P) according to Amaral (1972) colorimetry.

*In vitro digestibility and caecal fermentation.* The experiment was conducted in the laboratory of *in vitro* digestibility of non-ruminant species, in homogeneous

la actividad del ecosistema del ciego que se halla influenciada por uno de los factores más importante como son los nutrientes en la dieta (Knudsen 2014), por lo que es de gran trascendencia el uso del contenido cecal en las técnicas *in vitro*.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el valor nutritivo y la fermentación cecal *in vitro* en la harina de forraje de morera variedad YU 62 para conejos.

### Materiales y Métodos

El trabajo se desarrolló en el departamento de Ciencias Biofisiológicas del Instituto de Ciencia Animal, situado en el km 47 ½ de la Carretera Central, municipio de San José de las Lajas, provincia Mayabeque.

*Preparación de la fuente de alimento forrajero.* Se emplearon forrajes de morera (*Morus alba*) variedad YU 62 provenientes de una hectárea de la unidad experimental Guayabal conformada por tres campos con dos años de establecida en suelo ferralítico rojo.

En el manejo agronómico, se aplicó fertilización química con urea y orgánica basada en materia orgánica y humus de lombriz. El primer corte fue a los 12 meses después de la siembra y a partir de ahí, se efectuaron 11 cortes totales hasta julio del año 2014, fecha en que se obtuvo la planta con frecuencia de poda cada 50 días correspondiente al período lluvioso. El corte de la planta, se efectuó a la altura de 50 cm del suelo.

El proceso de muestreo se ejecutó de forma aleatoria en tres campos con la toma de dos muestras de materia fresca por campo con un peso de 1kg cada una. Se procedió al corte de los componentes de la biomasa comestible que fueron hojas y tallos los cuales se homogeneizaron y se desecharon los tallos leñosos. Con posterioridad se efectuó el secado al sol (36 horas)

El granulado de alfalfa (*Medicago sativa*) se adquirió en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se muestrearon 6 sacos, con la toma de 5 puntos por cada saco hasta lograr una recolección de 2kg de muestra por saco.

Todas las muestras (alfalfa y morera) se molieron en un molino de martillo de criba de 4 mm y se tamizaron a un 1mm para futuros análisis.

*Determinación de la composición química.* Se determinó la composición química por sextuplicado en muestras de harina de forraje de morera y alfalfa como control. Se determinaron los indicadores materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas y proteína bruta (PB), según el método descrito por la AOAC (2016). Las fracciones de de la pared celular (FDN, FDA y LAD) se determinaron por Goering y Van Soest (1970). La FDN y la FDA se corrigieron para cenizas y se realizó con la utilización de crisoles. La celulosa y la hemicelulosa se calcularon por la diferencia FDA-LAD y la FDN-FDA, respectivamente. El calcio (Ca) se determinó por absorción atómica y el fósforo (P) según Amaral (1972) por colorimetría.

*Determinación in vitro de la digestibilidad.* El

conditions of local temperature at 20 °C and relative humidity of 40 %.

For simulating *in vitro* digestive process in the anatomical segments of stomach, duodenal and caecal gastrointestinal tract (GIT), 2 g of samples (sieved to 1mm) were weighed with six repetitions per treatment (mulberry forage meal var. YU 62 and lucerne control) and per section of GIT. Samples were placed in muslin bags of 48-micron porosity and deposited in incubation tubes of 120 mL, distributed in water baths with agitation and temperature control.

The stomach-duodenum phase was developed according to the methodology described by Ramos *et al.* (1992), with the use of pepsin and pancreatin enzymes. Controls were placed to correct the results.

For the stomach phase, a solution of phosphate buffer (0.1 M and pH = 6) was prepared and 25 mL were added to each tube of incubation with the sample plus 10 mL of 0.2 M HCl and were homogenized. The pH was adjusted to 2 with 1 M solution of 0.1 N hydrochloric acid and 0.1 N sodium hydroxide. Then, 1 mL of freshly prepared pepsin solution containing 25 mg/mL pepsin (porcine) was added. It was capped with a rubber stopper with valves and was randomly inserted into a thermostated bath at 39 °C during 1.5 hours. At the end of the phase, pH was measured.

In the duodenal phase, 10 mL of a buffered phosphate solution (0.2 M, pH = 6.8) and 5 mL of a 0.6 M NaOH solution were added to each tube. The pH was adjusted to 6.8 with 1M NaCl and NaOH. Afterwards, 1 mL of freshly prepared pancreatin solution containing 100 mg/mL porcine pancreatin was added. The tubes were capped and placed in thermostated bath at 39 °C during 3.5 hours. At the end of the phase, pH was measured and the samples contained in the bags were weighed to determine CP.

In the caecal phase, it has used the previous tubes used in the stomach-duodenum phase. Freshly collected samples of caecal content were used to prepare the inoculum according to method described by Pascual *et al.* (2000). Nine young New Zealand White x White Semi-giant (2 kg of weight) showing a normal weight gain during the fattening period were randomly chosen prior to slaughtering. Animals consumed lucerne commercial concentrate. After adjusting pH to 6.9, 100 mL of inoculum were added to each tube and incubated at 39 °C in bath temperature-controlled for 48 hours. Upon completion of the incubation period, pH was measured and bags were washed with cold distilled water and ethyl alcohol 90 % and placed in the oven at 60 °C for 48 hours, for subsequent estimation of DM and NDF. Digestibility of DM, CP and NDF was calculated according to Ramos (1995).

Individual SCFA concentration in the preserved samples was determined by gas chromatography, on injecting 0.5 µL, after centrifuging for 8 min the vials

experimento se realizó en el laboratorio de digestibilidad *in vitro* de especies no rumiantes, en condiciones homogéneas de temperatura local a 20 °C y humedad relativa del 40 %.

Para la simulación del proceso digestivo *in vitro* en los segmentos anatómicos del tracto gastrointestinal (TGI) estomacal, duodenal y cecal, se pesaron 2 g de muestras (tamizadas hasta 1mm de tamaño de partícula) con seis repeticiones por tratamiento (harina de forraje de morera variedad YU 62 y control alfalfa) y por sección del TGI. Las muestras se colocaron en bolsas de muselinas de 48 micras de porosidad y se depositaron en tubos de incubación de 120 mL, distribuidos en baños de agua con agitación y control de temperatura según diseño completamente aleatorizado.

La fase estomacal-duodenal, se desarrolló según la metodología descrita por Ramos *et al.* (1992), con la utilización de las enzimas pepsina y pancreatina. Se colocaron blancos para corregir los resultados.

Para la fase del estómago, se preparó una solución tampón de fosfato (0,1 M y pH = 6) y se añadieron 25 mL a cada tubo de incubación con la muestra más 10 mL de HCl 0.2 M y se homogeneizaron. El pH se ajustó a 2 con solución 1 M de ácido clorhídrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N. Luego se añadió 1 mL de solución de pepsina recién preparada que contenía 25 mg/mL de pepsina (porcina). Se tapó con un tapón de goma con válvulas y se insertó aleatoriamente en un baño termostado a 39 °C durante 1,5 horas. Al final de la fase, se midió el pH.

En la fase duodenal, se añadieron a cada tubo 10 mL de una solución tampón de fosfato (0.2 M, pH = 6.8) y 5 mL de una solución de NaOH 0.6 M. El pH se ajustó a 6.8 con NaCl 1 M y NaOH. Después se añadió 1 mL de solución de pancreatina recién preparada que contenía 100 mg/mL de pancreatina porcina. Los tubos se taparon y se colocaron en un baño termostado a 39 °C durante 3.5 horas. Al final de la fase, se midió el pH y las muestras contenidas en las bolsas se pesaron para determinar el PC.

En la fase cecal, se utilizaron los tubos de la fase estómago-duodeno. Se usaron muestras recién recolectadas de contenido de cecal para preparar el inóculo de acuerdo con el método descrito por Pascual *et al.* (2000). Se seleccionaron aleatoriamente nueve jóvenes de Nueva Zelanda Blanco x Semi-gigante Blanco (2 kg de peso) que mostraban un aumento de peso normal durante el período de engorde antes del sacrificio. Los animales consumieron concentrado comercial de alfalfa. Después de ajustar el pH a 6.9, se añadieron 100 mL de inóculo a cada tubo y se incubaron a 39 °C en el baño con temperatura controlada durante 48 horas. Al finalizar el período de incubación, se midió el pH y las bolsas se lavaron con agua destilada fría y alcohol etílico al 90 % y se colocaron en estufa a 60 °C durante 48 horas, para la estimación posterior de DM y NDF. La digestibilidad de MS, PC y FDN se calculó de acuerdo con Ramos (1995).

La concentración de SCFA individual en las muestras conservadas se determinó mediante cromatografía de gases, al inyectar 0.5 µL, después de centrifugar durante

at 14 200 x g (Centrifuge ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel). A liquid-gas chromatograph DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A. Milan, Italy) was used equipped with a capillary column DN-FFAP (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 0.25  $\mu$ ) and a FID detector. H<sub>2</sub> was used as carrier gas and N<sub>2</sub> as auxiliary. Maximum temperature of the injector and detector was fixed at 200 and 250 °C, respectively. Also total SCFA were obtained by algebraic sum of the individual SCFA determined. The quotient of the concentration of acetic and propionic acids (Ac/Pp relationship) was calculated.

*Statistical analyses.* Variance analyses was performed using a completely randomized design, Fisher LSD test was used to know significant differences between treatments. Analyses of power (1- $\beta$ ) was applied to reject or to accept the null hypothesis in the necessary cases that in this case was considered a value above 0.80. Data were analyzed according to Di Rienzo *et al.* (2012).

### Results and Discussion

*Chemical composition.* Differences were observed (P < 0.0001) in the nutrient content of the foods under study, with higher percentage of DM and ash in the lucerne. However, OM, Ca and P were higher in the mulberry in accordance with the results reported by López *et al.* (2014). In studies conducted by Martin *et al.* (2014), referred that factors as the organic fertilization, sun dryness of the plant and the height of cutting, influence the increase of the tenor of organic matter and minerals as calcium and phosphorus. Table 1 shows chemical composition of forage meal of mulberry (*Morus alba* variety Yu-62) and lucerne.

8 min los viales a 14 200 x g (Centrífuga ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel). Se usó un cromatógrafo de gas líquido DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A. Milán, Italia) equipado con una columna capilar DN-FFAP (longitud 30 m, diámetro interno 0.32 mm, espesor de película 0.25  $\mu$ ) y un detector FID. H<sub>2</sub> se utilizó como gas portador y N<sub>2</sub> como auxiliar. La temperatura máxima del inyector y del detector se fijó a 200 y 250 °C, respectivamente. También se obtuvieron AGCC totales por suma algebraica de los AGCC individuales determinados. Se calculó el cociente de la concentración de ácidos acético y propiónico (relación Ac/Pp).

*Análisis estadístico.* Los análisis de varianza se realizaron a través de un diseño completamente aleatorizado. Se utilizó la dócima de Fisher LSD para conocer las diferencias significativas entre los tratamientos. Los análisis de potencia (1- $\beta$ ) se aplicaron para rechazar o aceptar la hipótesis nula en los casos necesarios, que en este caso se consideró un valor por encima de 0,80. Los datos se analizaron según Di Rienzo *et al.* (2012).

### Resultados y Discusión

*Composición química.* Se observó diferencia (P < 0.0001) en el contenido de nutrientes de los alimentos en estudio, con mayor porcentaje de MS y ceniza en la alfalfa. Sin embargo, la MO, Ca y P fueron superiores en la morera (P < 0.0001) de acuerdo con los resultados informados por López *et al.* (2014). En estudios realizados por Martin *et al.* (2014), refirieron que factores como la fertilización orgánica, el secado de la planta al sol y la altura de corte, influyen en la elevación del tenor de materia orgánica y minerales como el calcio y fósforo. En la tabla 1 se muestra la composición química de la harina de forraje de morera

Table 1: Chemical composition (% dry basis) of mulberry meal variety YU-62 and lucerne meal.

Indicators	Lucerne meal	Mulberry meal	P-value	SEM $\pm$
Dry Matter (DM)	92.77	90.64	P<0.0001	0.09
Organic matter (OM)	86.86	90.49	P<0.0001	0.18
Ash	13.13	9.50	P<0.0001	0.18
Crude protein (CP)	17.5	14.73	P<0.0001	0.15
Crude fibre (CF)	24.10	28.06	P<0.0001	0.31
Neutral detergent fibre (NDF)	41.8	54	P<0.0001	0.19
Acid detergent fibre (ADF)	32.63	38.64	P<0.0001	0.18
Cellulose	25.32	30.57	P<0.0001	0.18
Hemicellulose	9.16	15.35	P<0.0001	0.27
Lignin (ADL)	7.30	8.04	P<0.0001	0.02
Calcium (Ca)	1.44	1.65	P<0.0001	0.03
Phosphorus (P)	0.22	0.29	P<0.0001	0.005

SEM: standard error of mean.

Mulberry forage meal presented the lowest values (P < 0.0001) of CP in relation to the lucerne, in correspondence with those cited by Joromocoj (2012) where the protein content is attenuated in the integral forage and tends to be higher when leaves are used and

(*Morus alba* variedad YU-62) y alfalfa.

La harina de forraje de morera presentó los valores inferiores (P < 0.0001) de PB en relación con la alfalfa, en correspondencia con los citados por Joromocoj (2012) en el que el contenido proteico es atenuado en el forraje

lowest when the stems are included.

This also influenced the high percentages ( $P < 0.0001$ ) of the fibrous constituents (crude fiber, NDF, ADF, cellulose, hemicellulose and lignin) that were higher than lucerne, with higher emphasis for neutral detergent fiber (NDF). This can be attributed, besides to the time established for the plant with more than one year, to a cutting frequency of 50 days with little rainfall regime (García *et al.* 2006).

*In vitro* digestibility and caecal fermentation. Table 2 shows digestibility of crude protein (CP) and values in pH, according to two phases of incubation (stomach and duodenal). There were differences among treatments ( $P < 0.0001$ ) for the analyzed indicators. In the stomach phase, pH increased in mulberry forage meal according to Dihigo (2007), this could be caused by the high content of saponin and calcium, which reacts with the acid medium.

integral y tiende a ser mayor cuando se utilizan las hojas y menor al incluirse los tallos.

Lo anterior influyó también en los altos porcentajes ( $P < 0.0001$ ) de los constituyentes fibrosos (fibra bruta, FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y lignina) que se hallaron por encima de la alfalfa, con mayor énfasis para la fibra detergente neutro (FDN). Esto se puede atribuir, además del tiempo de establecida la planta con más de un año, a la frecuencia de poda de 50 días con poco régimen de precipitaciones (García *et al.* 2006).

*Fermentación cecal y digestibilidad in vitro.* En la tabla 2 se muestran la digestibilidad de proteína bruta (PB) y valores de pH según las dos fases de incubación (estomacal y duodenal). Hubo diferencias entre los tratamientos ( $P < 0.0001$ ) para los indicadores analizados. En la fase estomacal aumentó el pH en la harina de forraje de morera que según Dihigo (2007), que pudiera deberse al alto contenido de saponina y calcio que

Table 2: *In vitro* digestibility (%) of CP and pH values of mulberry meal variety Yu-62 and lucerne meal.

Indicators Foods	Values of pH		% d CP (Duodenal)
	Stomach	Duodenal	
Lucerne meal	2.55	6.24	32.84
Mulberry meal	3.08	6.03	55.48
SEM ±	0.01	0.01	0.44
P-value	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
1-β	0.99	0.99	0.99

SEM: standard error of mean.

However, in the duodenal phase, due to the high buffering capacity of mulberry, pH was lower compared to lucerne and a suitable acid-basic balance was achieved. This agrees with results of Dihigo (2007) and, according to Michelland *et al.* (2010), contributed to a better enzymatic activity of pancreatin, reason why protein digestibility ( $P < 0.0001$ ) was higher than the values found in lucerne.

The lower digestibility of proteins in lucerne, could be due to the content of antinutritional components such as soluble tannins which form indigestible complexes with proteins and interfere with their digestibility (Legendre *et al.* 2017). The concentration of these secondary metabolites depends on factors such as genotype and parts of the plant as it has shown higher concentration in the seed than in the aerial portions and the latter are usually present in high proportion when the plant is cut very early or too late in the growth stage (Gawel, 2012). Authors such as De Blas *et al.* (2010), report concentrations of soluble tannins in lucerne of 3 to 4 %. With regard to the mulberry, researches that have been realized recount absence of tannins that precipitate proteins and content of total polyphenols from 1.05 to 2.89 % (Savón *et al.* 2017).

In mulberry meal, digestibility of dry matter

reacciona con el medio ácido.

Sin embargo, en la fase duodenal, debido a la alta capacidad amortiguadora de la morera, el pH fue menor en comparación con la alfalfa y se logró un adecuado equilibrio ácido-básico. Lo anterior está en concordancia a lo referido por Dihigo (2007) y, de acuerdo con lo informado por Michelland *et al.* (2010), contribuyó a una mejor actividad enzimática de la pancreatina, por lo que la digestibilidad de proteína ( $P < 0.0001$ ) fue mayor que en los valores encontrados en alfalfa.

La menor digestibilidad de las proteínas en la alfalfa, pudiera estar dada por el contenido de componentes antinutricionales tales como taninos solubles que forman complejos indigestibles con las proteínas e interfieren en su digestibilidad (Legendre *et al.* 2017). La concentración de estos metabolitos secundarios depende de factores como genotipo y partes de la planta ya que se ha evidenciado mayor concentración en la semilla que en las porciones aéreas y en estas últimas suelen estar presente en alta proporción cuando la planta se corta muy temprano o demasiado tarde en su etapa de crecimiento (Gawel 2012). Autores como De Blas *et al.* (2010) reportaron concentraciones de 3 a 4 % de taninos solubles en alfalfa. Con respecto a la morera, investigaciones recuentan la ausencia de taninos que precipitan proteínas y un contenido total de polifenoles de 1.05 a 2.89 % (Savón *et al.* 2017).

(DM) was higher than the values found in lucerne influenced by the higher digestibility for NDF. This is due to its high content of hemicellulose in the cecum and has a favorable effect on the activity of the caecal microbiota that coincides with the increase of short-chain fatty acid (SCFA) mainly acetic and butyric (Safwat *et al.*, 2014) (table 3), with significant difference ( $P < 0.0001$ ) with lucerne. In addition, it should be noted that increasing SCFA lowers pH, tending to neutrality (Cossu 2014 and Gaafar and Ayat 2014), as between the two variables, there is an inverse relationship, reflecting the strong interaction of caecal ecosystem with the feed rate, when it contains easily digestible fiber (Jacquier *et al.* 2013).

En la harina de morera, la digestibilidad de materia seca fue mayor que los valores encontrados en la alfalfa, influenciado por la mayor digestibilidad de FDN. Esto es debido al alto contenido de hemicelulosa en el ciego y ejerce un efecto favorable en la actividad de la microbiota cecal que coincide con el incremento de los ácidos grasos de cadena corta (AGCCt), principalmente el acético y butírico (Safwat *et al.* 2014) (tabla 3), con diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) con la alfalfa. Además, hay que resaltar que al aumentar los AGCCt disminuye el valor del pH, con tendencia a la neutralidad (Cossu 2014 y Gaafar and Ayat 2014), ya que entre las dos variables existe una relación inversamente proporcional que refleja la fuerte interacción del ecosistema cecal con el

Table 3: Caecal *in vitro* digestibility (%), pH and short-chain fatty acid (mmol/L) of mulberry meal variety Yu-62 and lucerne meal.

Indicators	Lucerne meal	Mulberry meal	SEM $\pm$	P-value	1- $\beta$
Digestibility of dry matter (%)	36.47	54.92	0.48	$P < 0.0001$	0.99
Digestibility of NDF (%)	31.75	43.11	0.41	$P < 0.0001$	0.99
pH	6.84	6.66	0.01	$P < 0.0001$	0.99
Short-chain fatty acid (SCFA)	74.9	81.7	0.55	$P < 0.0001$	0.99
Acetate (mmol/L)	41.5	48.2	0.33	$P < 0.0001$	0.99
Propionate (mmol/L)	12.4	8.9	0.28	$P < 0.0001$	0.99
Butyrate (mmol/L)	12.9	14.9	0.34	$P = 0.002$	0.97
Other SCFA (mmol/L)	8.1	9.7	0.05	$P < 0.0001$	0.99

SEM: standard error of mean.

In mulberry forage meal, propionic/butyric ratio was low (0.59) compared to lucerne (0.96) (0.02 SE  $P < 0.0001$ ). Authors such as Blas (2013) and Pinzon (2014) argued that when the diet is rich in fiber, concentration of caecal propionic acid decreases with less propionic/butyric ratio of 1.

It is concluded that mulberry forage meal variety YU 62 has a positive *in vitro* nutritive value, so that it could be used instead of lucerne as an alternative raw material in the formulation of diets for rabbit feeding and, further studies of *in vivo* digestibility and metabolic profile are suggested.

### Acknowledgements

Thanks to Natacha Pompa, Doremis Rosales, Yusmelis Ramos and Ibett Orta for their collaboration with laboratory tests, as well as to Lucía Sarduy and Magaly Herrera Villafranca for the accomplishment of statistical analyses.

régimen de alimentación cuando el mismo contiene fibra fácilmente digestible (Jacquier *et al.*, 2013).

En la harina de forraje de morera, la relación propiónico/butírico fue baja (0.59) en comparación con la alfalfa (0.96) (EE 0.02  $P < 0.0001$ ). Autores como Blas (2013) y Pinzon (2014) alegaron que cuando la dieta es rica en fibra, disminuye la concentración cecal de ácido propiónico con una relación propiónico/butírico menor de 1.

Se concluye que la harina de forraje de morera variedad YU 62 posee un valor nutritivo *in vitro* positivo por lo que se puede utilizar para sustituir a la alfalfa como materia prima alternativa en la formulación de dietas para la alimentación cunícola, y se sugiere, posteriormente, la realización de estudios de digestibilidad *in vivo* y perfil metabólico.

### Agradecimientos

El autor agradece a las compañeras Natacha Pompa, Doremis Rosales, Yusmelis Ramos e Ibette Orta por la colaboración prestada en los análisis de laboratorio, así como a Lucía Sarduy y Magaly Herrera Villafranca por la realización de los análisis estadísticos.

### References

- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis. Ass. Off. Agric. Chem. 20th ed. Washington, D.C.
- Amaral, A. 1972. Técnicas analíticas para evaluar macronutrientes en cenizas de vainas de caña de azúcar. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, p 35.
- Blas, I. 2013. Utilización de piensos con lactoreemplazante en conejo de cebo. Master Thesis. Universidad Politécnica de Valencia, España. 26 pp.

- Cossu, M. E. 2014. Algunos conceptos sobre la nutrición del conejo para carne. In: Tecnología de producción de conejos para carne. Uruguay. Editorial INIA. p. 63-79.
- De Blas, C., Mateos, G.G. & Rebollar, P.G. 2010. Alfalfa. In: Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de los alimentos para la fabricación de piensos compuestos. España. 3ra edición. p.282-283.
- Dihigo, L.E. 2007. Características físico-química de productos tropicales y su impacto en la morfofisiología digestiva del conejo. Habana. PhD Thesis. Universidad Agraria de la Habana, Cuba.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. 2012. InfoStat version 2012. Grupo InfoStat, FCA. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.
- Gaafar, H.M.A. & Ayat, A. 2014. Effect of diet supplemented with pumpkin (*Cucurbita moschata*) and black seed (*Nigella sativa*) oils on performance of rabbit: 1- Growth performance, blood haematology and carcass traits of growing rabbit. Report and Opinión. 6: 52-59.
- García, D., Noda, Y., Medina, M., Martín, G. & Soca, M. 2006. La morera: una alternativa viable para los sistemas de alimentación animal en el trópico. Avances en investigación agropecuarias. 10: 55-72.
- Gawel, E. 2012. Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 11: 303-310.
- Goering, H. K. & Van Soest P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications), Agric. Handbook No. 379. Ars- USDA. Washington, DC.
- Jacquier, V., Combes, S., Oswald, I.P., Rogel-Gaillard, C. & Gidenne, T. 2013. Incorporation de fibres rapidement fermentescibles dans un aliment périsévère: impact sur la digestion, la croissance et l'état sanitaire du lapin. 15èmes Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 novembre 2013, Le Mans, France
- Joromocoj, E.D. 2012. Evaluación del contenido de proteína y biomasa en la morera (*Morus alba*, L.; Moraceae) con la aplicación de tres fuentes orgánicas de fertilización, en sololá, Guatemala. Graduated Thesis. Universidad Rafael Landívar, Quetzaltenango, Guatemala.
- Knudsen, C. 2014. Strategies de limitation de l'ingestion chez le lapin: optimisation des performances zootechniques, impacts physiologiques et consequences sur la santé digestive. These de Docteur en Sciences. Université de Toulouse, France.
- Legendre, H., Hoste, H., Gombault, P., Routier, M., Bannelier, C. & Gidenne, T. 2017. Valeur nutritive du sainfoin déshydraté, lors d'une forte substitution dans un régime à base de luzerne dans l'alimentation du lapin en croissance. 17èmes Journées de la Recherche Cunicole, 21 et 22 novembre 2017, Le Mans, France
- López, B., Iser, M., Cisnero, M., Ramírez, J.L., Valdiviá, M. & Savón, L. 2014. Inclusión de la harina de Morera (*Morus alba*) en el desempeño productivo de conejos. Revista de producción animal 26: 2-8.
- Martin, G.J., Pentón, G., Noda, Y., Contino, Y., Díaz, M., Ojeda, F., Jiménez, F.A., López, O., Agramonte, D., Milera, M. & Prieto, M. 2014. Comportamiento de la morera (*Morus alba* L.) y su impacto en la producción animal y la crianza de gusanos de seda en Cuba. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 48: 73-77.
- Michelland, R.J., Combes, S., Monteils, V., Cauquil, L., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. Anaerobe, 16, 61-65.
- Pascual, J., Fernández-Carmona, J., Fernández, Díaz, J. R., Garcés, C., Rubert-Alemán, J., Llopis & Muelas. R. 2000. Nutritive evaluation of rabbit diets by different *in vitro* digestibility Methods. J of World Rabbit Sci Association. 8: 385-389.
- Pinzon, O.F. 2014. Evaluación del efecto del uso de bloques multinutricionales basados en morera sobre los parámetros productivos de conejos Nueva Zelanda. Departamento de Boyacá. Trabajo presentado como requisito parcial para optar por el título de Zootecnista—Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia. 78pp.
- Ramos. M., Carabaño, R & Boisen. 1992. An *in vitro* methods for estimating digestibility in Rabbit. J. Appl. Rabbit Res. 15: 938-946.
- Ramos, M.A. 1995. Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión *in vitro* a la valoración nutritiva de piensos en conejo. Madrid. PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Rebours, G., Vastel, P., Bouchier, M., Faussier, G. & Reys, S. 2017. Comparaison de deux méthodes de dosage de la fraction de lignineuse sur des matières premières fibreuses: impact sur le risque de trouble digestifs chez le lapin en croissance. 17èmes Journées de la Recherche Cunicole, 21 et 22 novembre 2017, Le Mans, France
- Savón, L., Gutierrez, O. & Febles, G. 2017. Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean. La Habana. EDICA. 280p. ISBN: 978-959-7171-72-0.
- Safwat, M.A., Sarmiento-Franco, L. & Santos-Ricalde, R.H. 2014. Rabbit Production using local resources as feedstuffs in the tropics. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 17: 161-171.

Received: February 12, 2018