



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

BIOHIDROGENACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS CON NIVELES CRECIENTES DE TANINOS EN UN SISTEMA RUMINAL *IN VITRO*

EDGAR PLIEGO HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Biohidrogenación de ácidos grasos con niveles crecientes de taninos en un sistema ruminal *in vitro***, realizada por el alumno: **Edgar Pliego Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

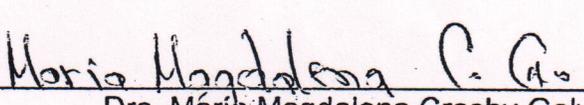
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



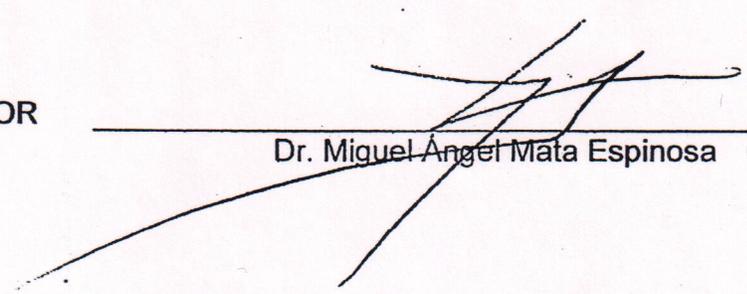
Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR



Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR



Dr. Miguel Ángel Mata Espinosa

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2015

BIOHIDROGENACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS CON NIVELES CRECIENTES DE TANINOS EN UN SISTEMA RUMINAL *IN VITRO*

Edgar Pliego Hernández, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el grado de biohidrogenación de los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva (AO) por bacterias ruminales, con la inclusión de taninos condensados (TC) en un sistema ruminal *in vitro* usando alfalfa (Al) como sustrato. Se evaluaron tres niveles de inclusión (0, 2.5 y 5 %) de AO y de TC, respectivamente, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3, generando nueve tratamientos, T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5% Al; T3= 0% AO, 5% TC y 95% Al; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al; Se determinó el perfil de ácidos grasos del medio de cultivo al final de la incubación *in vitro* (72 h), pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃), la producción de metano (CH₄), degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y desaparición de FDN y FDA. Las medias de los tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey (P <0.05). La concentración de ácido oleico se incrementó (P<0.05) a medida que incrementaron los niveles de aceite y de taninos condensados. Los niveles más altos (P<0.05) de linoleico y linolénico se registraron en el tratamiento T3, observándose valores de 8.51 y 7.47 mg 100 mg⁻¹, para linoleico y linolénico, respectivamente. Cuando se incrementaron los niveles de aceite y taninos se registraron los niveles más bajos (P<0.05) de linoleico (T4, T7, T8 y T9) y linolénico (T4 y T7). Los tratamientos evaluados no afectaron (P>0.05) el pH de los medios de cultivo, pero la concentración de N-NH₃ si mostró cambios (P<0.05) entre tratamientos, observándose las concentraciones más altas en el T7 y las más bajas en el T6 y T9. Así

mismo, la mayor ($P<0.05$) producción de metano se presentó en el tratamiento testigo (T1, 0.3608mMol) y los tratamientos T6 y T9 propiciaron la mayor reducción de este gas (0.2243y 0.2337mMol, respectivamente). La DIVMS a las 72 h mostró cambios ($P<0.05$) y fue más alta en los tratamientos T1, T4 y T7, y la DIVMS más baja se presentó en los tratamientos T9, T6 y T8. La desaparición *in vitro* de la FDN fue más alta ($P<0.05$) en los tratamientos T3, T5, T6, T8 y T9 y la más baja ($P<0.05$) en T1 y T4. La desaparición *in vitro* de la FDA fue mayor ($P<0.05$) en T3, T6 y T8 y la menor ($P<0.05$) se observó en T1, T2 y T7. Este estudio demuestra que la biohidrogenación del ácido oleico en un medio ruminal *in vitro* no es afectada por la presencia de niveles de 2.5 y5% de taninos condensados; sin embargo, esta concentración de taninos si afecta parcialmente la biohidrogenación del ácido linoleico y de forma significativa la de linolénico, la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de metano.

Palabras clave: Ácidos grasos, biohidrogenación, taninos, *in vitro*, bacterias ruminales.

FATTY ACIDS BIOHYDROGENATION IN *IN VITRO* RUMEN SYSTEM WITH INCREASING LEVELS OF TANNINS

Edgar Pliego Hernández, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the degree of biohydrogenation of fatty acids of olive oil (OO) by rumen bacteria with the inclusion of condensed tannins (CT) in an *in vitro* rumen system using alfalfa (Al) as substrate. Three levels of inclusion were evaluated (0, 2.5, and 5%, for OO and CT, respectively) in a completely random design with 3 x 3 factorial arrangement, resulting in nine treatments: T1= 0% OO, 0% CT, and 100% Al; T2= 0% OO, 2.5% CT, and 97.5% Al; T3= 0% OO, 5% C, and 95% Al; T4= 2.5% OO, 0% CT, and 97.5% Al; T5= 2.5% OO, 2.5% CT, and 95.0% Al; T6= 2.5% OO, 5% CT, and 92.5% Al; T7= 5% OO, 0% CT, and 95% Al; T8= 5% OO, 2.5% CT, and 92.5% Al; T9= 5% OO, 5% CT, and 90% Al. The fatty acid profile of the culture medium was determined at the end of the *in vitro* incubation (72 h), as well as pH, ammonia nitrogen (N-NH₃), methane (CH₄) production, *in vitro* degradation of dry matter (IVDDM), NDF, and ADF. The means of the treatments were compared with the Tukey test (P<0.05). The concentration of oleic acid increased (P<0.05) as the levels of oil and condensed tannins increased. The highest levels (P<0.05) of linoleic and linolenic acids were registered in treatment T3, with values of 8.51 and 7.47 mg 100 mg⁻¹, for linoleic y linolenic acid, respectively. When the levels of oil and tannins increased, the lowest levels (P<0.05) of linoleic (T4, T7, T8, and T9) and linolenic (T4 and T7) acids were registered. The evaluated treatments did not affect (P > 0.05) the pH of the culture, although the N-NH₃ concentration did change (P<0.05) between treatments, with the highest concentrations in T7 and the lowest in T6 and T9. Likewise, the highest (P<0.05) methane production was in the control treatment (T1, 0.3608 mMol) while treatments T6 and T9

showed the greatest decrease of the gas (0.2243 and 0.2337 mMol, respectively). The IVDDM changed ($P < 0.05$) at 72 h and was highest in treatments T1, T4, and T7, while the lowest IVDDM was in treatments T9, T6, and T8. The highest ($P < 0.05$) *in vitro* disappearance of NDF was in treatments T3, T5, T6, T8, and T9, while the lowest ($P < 0.05$) was in treatments T1 and T4. *In vitro* disappearance of ADF was greater ($P < 0.05$) in T3, T6, and T8, while the lowest ($P < 0.05$) was in T1, T2, and T7. This study demonstrates that the oleic acid biohydrogenation in an *in vitro* rumen medium is not affected by the presence of 2.5 and 5% condensed tannins; however, tannins affects linoleic and linolenic acid biohydrogenation, ammonia nitrogen concentration and methane production.

Keywords: Fatty acids, biohydrogenation, tannins, *in vitro*, rumen bacteria.

DEDICATORIAS

Dedicación especial a mi esposa María Guadalupe, por todo el apoyo y paciencia al concluir este proyecto de vida, por todos los momentos felices que me ha brindado y por su puesto la dicha de regalarme lo más preciado que cualquier padre quisiera tener, un hijo que disfrutar.

No tengo las suficientes palabras para poder plasmar en este pequeño texto del sentir y expresar el cariño que he tenido de ti mi pequeñito Mateo, con mucho esmero y dedicación este logro es para ti también.

Dedicada con mucho cariño y amor para mi querida madre Gloria Hernández, una vez más me has apoyado a más no poder en terminar otra fase de mi meta, te agradezco de todo corazón.

Dedicada a mi querido viejo Elpidio Pliego, duele que ya no estés aquí para darte un abrazo de felicidad al concluir este proyecto que iniciamos juntos, que dios te cuide.

Dedicada a todos mis hermanos que en su momento me apoyaron incondicionalmente en el transcurso de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios padre por permitirme seguir adelante y darme la fortaleza de concluir con este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante la estancia de Maestría.

Al Comité de Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por brindarme la oportunidad de pertenecer como estudiante de maestría del postgrado.

Al Dr. David Hernández Sánchez, por confiar en el proyecto y por su calidad humana.

A la Dra. María Magdalena por su apoyo en el laboratorio de nutrición animal y en la realización de la de tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Mata Espinosa por su apoyo incondicional en finalizar el trabajo de tesis.

A la Ing. Margarita Crosby Galván por ser participe en el desarrollo del proyecto en el laboratorio de Nutrición animal.

Sinceros agradecimientos al Dr. Oscar del Razo y a la Dra. Verónica del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) Tulancingo, Hidalgo, por su valioso apoyo en el análisis de metano.

Agradezco por su apoyo incondicional a mi compadre Juan Luis Gómez y a mis compañeros Adrián Cuautle, Adrián Gloria, Omar Cabañas, Ismael, Alfredo por hacer una estancia muy agradable.

Gracias a todos.

CONTENIDO

Página

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Características físico químicas del rumen.....	2
2.2 Metabolismo de lípidos en rumiantes	2
2.3 Proceso bioquímico de Biohidrogenación	4
2.4 Biohidrogenación de ácido oleico en estudios <i>in vitro</i>	6
2.5 Importancia de los ácidos grasos insaturados en el humano.....	7
2.6 Biosíntesis de Taninos	9
2.7 Importancia de los taninos en la alimentación de rumiantes	10
2.7.1 Taninos condensados y su efecto sobre el pH.....	10
2.7.2 Taninos condensados y su efecto sobre nitrógeno amoniacal.....	11
2.7.3 Taninos condensados y su efecto en la producción de metano	12
2.7.4 Taninos condensados y su efecto en la digestibilidad de la MS, FDN y FDA	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos particulares	14
4. HIPÓTESIS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Localización.....	15
5.2 Desarrollo del experimento.....	15
5.3 Establecimiento del experimento	16
5.4 Análisis de materia seca	16

5.5	Análisis de cenizas	16
5.6	Proteína total	17
5.7	Determinación de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA). ...	17
5.8	Análisis de taninos condensados	21
5.8.1	Determinación de fenoles totales	21
5.8.2	Remoción de los taninos de los extractos con acetona.....	21
5.8.3	Determinación de taninos totales	22
5.9	Producción de gas <i>in vitro</i>	22
5.9.1	Obtención de líquido ruminal.....	22
5.9.2	Preparación del inóculo	22
5.9.3	Preparación de los viales	23
5.9.4	Medición de gas	23
5.10	Producción de Biogás (CH ₄).....	25
5.10.1	Trampa de captura de biogás.....	25
5.10.2	Medición de metano (CH ₄)	26
5.11	Determinación del perfil de ácidos grasos	26
5.12	Determinación de pH	27
5.13	Determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	28
5.14	Determinación de biogás (CH ₄)	28
5.15	Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca.....	29
5.16	Digestibilidad <i>in vitro</i> de FDN y FDA	30
5.17	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1	Perfil de ácidos grasos	33
6.2	pH.....	36

6.3 Nitrógeno amoniacal	37
6.4 Producción de biogás metano	38
6.5 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca.....	40
6.6 Materia residual de la fibra detergente neutro	43
6.7 Materia residual de la fibra detergente ácido	46
7. CONCLUSIONES	48
8. LITERATURA CITADA	49

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales fuentes de ácidos grasos insaturados de algunos aceites	8
Cuadro 2. Tratamientos experimentales	15
Cuadro 3. Composición química de los sustratos con niveles crecientes de inclusión de aceite de oliva y taninos de quebracho	20
Cuadro 4. Componentes de la técnica de gas <i>in vitro</i>	24
Cuadro 5. Componentes totales de la técnica gas <i>in vitro</i>	25
Cuadro 6. Perfil de ácidos grasos (mg 100 mg ⁻¹ del total de ácidos grasos) a 72 h pos incubación <i>in vitro</i> de alfalfa con niveles crecientes de aceite de oliva y de taninos condensados	35
Cuadro 7. Determinación de nitrógeno amoniacal, gas metano (CH ₄) y pH a 72 h pos incubación <i>in vitro</i> de alfalfa con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados	39
Cuadro 8. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS) a 72 h pos incubación con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados.....	42
Cuadro 9. Materia residual de la fibra detergente neutro de alfalfa a 72 h pos incubación <i>in vitro</i> con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados	45
Cuadro 10. Materia residual de la fibra detergente ácido de alfalfa a 72 h pos incubación <i>in vitro</i> con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados.	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Biohidrogenación del ácido linoleico (Buccioni <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figura 2. El rol <i>Butyrivibrio spp.</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> y <i>Butyrivibrio proteoclasticum</i> sobre el metabolismo de ácidos grasos insaturados linoleico y oleico (Buccioni <i>et al.</i> , 2012).7	7
Figura 3. Síntesis de taninos condensados (Aerts <i>et al.</i> , 1999).....	9

1. INTRODUCCIÓN

Los lípidos de la dieta que entran al rumen se presentan generalmente en forma de triglicérido, fosfolípidos y galactolípidos, la primera transformación que sufren es la lipólisis (Kim *et al.*, 2009) y posteriormente la biohidrogenación (Buccioni *et al.*, 2012), este proceso se lleva a cabo exclusivamente por bacterias ruminales que modifican a los ácidos grasos insaturados a saturados y *trans*, las principales cepas de bacterias involucradas en la biohidrogenación son *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Anaerovibrio lipolytica* (Kim *et al.*, 2009; Buccioni *et al.*, 2012). Sin embargo, existe el interés en modificar algunos ácidos grasos insaturados, por los beneficios que proveen a la salud humana, y que se encuentran en productos lácteos o cárnicos derivados de rumiantes. El ácido graso insaturado oleico se caracteriza por su bajo porcentaje de biohidrogenación en rumen (21 % menos en comparación con otros ácidos grasos poliinsaturados), y permite que una parte de éste escape a nivel duodenal y se deposite en músculos (Duckett *et al.*, 2002). Por lo tanto, incrementar los niveles de oleico se puede lograr a través de estrategias nutricionales inhibiendo la biohidrogenación ruminal (BH) o en su caso, la acumulación en el rumen (Toral *et al.*, 2013). La biohidrogenación de ácidos grasos es disminuida por la presencia de taninos condensados en el forraje y cuando son añadidos a la dieta, a dosis de 2% (Toral *et al.*, 2013) y 7.9% (Khiaosa *et al.*, 2009), Smith *et al.* (2005) reportan concentraciones de taninos condensados (0.7 a 2%) que tienen efecto sobre la composición de las poblaciones bacterianas, inhibiendo la actividad de endoglucanasas en bacterias fibrolíticas como actividad extracelular. Por otra parte, Jayanegara *et al.* (2012) en un metaanálisis con estudios *in vitro*, confirman que incrementar el nivel de taninos condensados entre > 2 y $\leq 10\%$ en la dieta disminuye la emisión de CH₄ ruminal. Sin embargo, los estudios *in vivo* e *in vitro* no han sido concluyentes y varios experimentos apuntan hacia direcciones opuestas. En cualquier caso, los resultados sobre este tema son todavía limitados e inconsistentes (Toral *et al.*, 2013).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características físico químicas del rumen

El ambiente ruminal es caracterizado por una población de bacterias de 10^{10} , protozoarios de 10^7 , cepas de hongos de 10^6 por mL de líquido ruminal fresco, con temperatura que oscila entre 38 a 39 °C, pH entre 6.0 y 6.7, y un potencial de óxido reducción de -150 a -350 mV. La modificación de estas condiciones puede influenciar en la población microbiana y los productos de la fermentación (Buccioni *et al.*, 2012).

2.2 Metabolismo de lípidos en rumiantes

El metabolismo lipídico ruminal se ha centrado principalmente en la manipulación de eventos fisicoquímicos en el rumen dirigidas a dos resultados prácticos: 1) Control de los efectos antimicrobianos de los ácidos grasos para que la grasa adicional pueda ser alimento a los rumiantes sin interrupción de la fermentación ruminal y digestión y 2) Regulación de biohidrogenación microbiana para alterar la absorción de ácidos grasos seleccionados que pueden mejorar el rendimiento o reducir la saturación en carne y leche (Jenkins, 1993).

La composición de lípidos de los forrajes es basado en dos clases de lípidos que consiste en gran parte de glicolípidos y fosfolípidos, y los ácidos grasos principales son los insaturados linoléico ($C_{18:3}$) y ácido linoleico ($C_{18:2}$). En contraste, la composición lipídica de los aceites de semillas utilizadas en los piensos de concentrado contienen predominantemente lípidos no polares triglicéridos, ácido linoleico y ácido oleico ($C_{18:1}$ Cis -9) como ácidos grasos insaturados predominantes (Bauman *et al.*, 1999).

Los lípidos dietéticos que entran al rumen son generalmente triacilgliceroles, fosfolípidos y galactoacilgliceroles. Y sufren dos importante transformaciones; La primera

transformación que sufren los lípidos es la lipólisis (Kim *et al.*, 2009), se hidrolizan ampliamente por las lipasas microbianas, los triacilglicerolés a ácidos grasos libres y glicerol; los fosfolípidos a ácidos grasos libres, fosfato y glicerol y galactoacilglicerolés se hidrolizan a glicerol, ácidos grasos y galactosa (Castillo *et al.*, 2013), esta etapa es fundamental para la segunda transformación; biohidrogenación de ácidos grasos que consiste en la reducción del número de dobles enlaces en la cadena de carbono de los ácidos grasos (Bauman *et al.*, 1999; Buccioni *et al.*, 2012) la vida media de los ácidos grasos libres es corta en el contenido ruminal, porque son rápidamente hidrogenados por las bacterias a productos finales más saturados (Jenkins, 1993). Las bacterias se dividen en dos grupos; basados sobre las reacciones y productos finales de la biohidrogenación, grupo A capaces de hidrogenar ácido linoleico y ácido alfa-linoleico a C18:1 *trans-11* como su mayor producto final, el grupo B utiliza C18:1 *trans-11* como uno de los principales sustratos con esteárico siendo el producto final (Bauman *et al.*, 1999). Sin embargo, una bacteria importante *Anaerovibrio lipolytica*, más conocida por su actividad de lipasa, produce una esterasa unida a la célula y una lipasa. Esta lipasa hidroliza acilglicerolés completamente a ácidos grasos libres y glicerol con poca acumulación de mono o diglicéridos. El glicerol se fermenta rápidamente, y se incorpora rápidamente a la glicolisis para la producción de piruvato, el cual, es posteriormente transformado en ácido propiónico mediante el proceso de fermentación anaerobia (Castillo *et al.*, 2013) como un producto principal final. El número de microorganismos capaces de hidrolizar esterés es bajo, y su actividad es altamente específica, por ejemplo, cepas de *Anaerovibrio lipolytica* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, que hidrolizan lípidos por su enzima esterase es mínima comparada con otras bacterias, siendo no necesariamente capaces de hidrolizar ésterés lipídicos, no obstante, son de las principales bacterias que pueden hidrolizar los ácidos grasos de cadena larga (Jenkins, 1993) a menudo la actividad de lipasa también

ocurre en protozoarios ciliados, pero no en hongos (Bauman *et al.*, 1999; Buccioni *et al.*, 2012).

2.3 Proceso bioquímico de Biohidrogenación

Las propiedades de los lípidos que determinan sus efectos antimicrobianos en el rumen, incluyen el tipo de grupo funcional, grado de insaturación, la formación de sales de carboxilato, y asociación física de los lípidos con la superficie de las partículas del alimento y las bacterias. Aparentemente, la biohidrogenación contribuye poco con la utilización de hidrógeno; sólo de 1 a 2% de hidrógeno metabólico se utiliza para este fin (Jenkins, 1993).

La ruta de saturación en la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados se lleva a cabo casi exclusivamente por bacterias del rumen. Sin embargo, los protozoarios no participan en dicho evento, su atribución al contenido de ácidos grasos es por simbiosis con bacterias, los hongos participan pero en menor proporción que las bacterias. Algunas bacterias de importancia en la biohidrogenación como *Anaerovibrio lipolytica*, realizan esta actividad mediante lipasas extracelulares que hidroliza fosfolípidos y galactolípidos; también bacterias del género *Butyrivibrio* tienen la capacidad de hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos (Kim *et al.*, 2009).

El establecimiento de un grupo carboxilo libre es la primera etapa crítica antes de que la hidrogenación pueda proceder. La primera etapa en la saturación tanto de ambos ácidos grasos 18:2 n-6 y 18:3 n-3 implica una reacción de isomerización que convierte el doble enlace *cis*-12 a un isómero *trans*-11, lo que resulta en CLA y CALA (ácido linolénico conjugado), respectivamente. La hidrogenación del enlace *cis*-9 puede entonces proceder por una reductasa microbiana, con la formación de ácido vaccénico (AV). La etapa final de la ruta de biohidrogenación ruminal implica una hidrogenación más del doble enlace *trans*-11

produciendo 18:00 (ruta 18:2 n-6) o *trans* - 15 18:01 (ruta 18:3 n-3) (Kim *et al.*, 2009; Buccioni *et al.*, 2012).

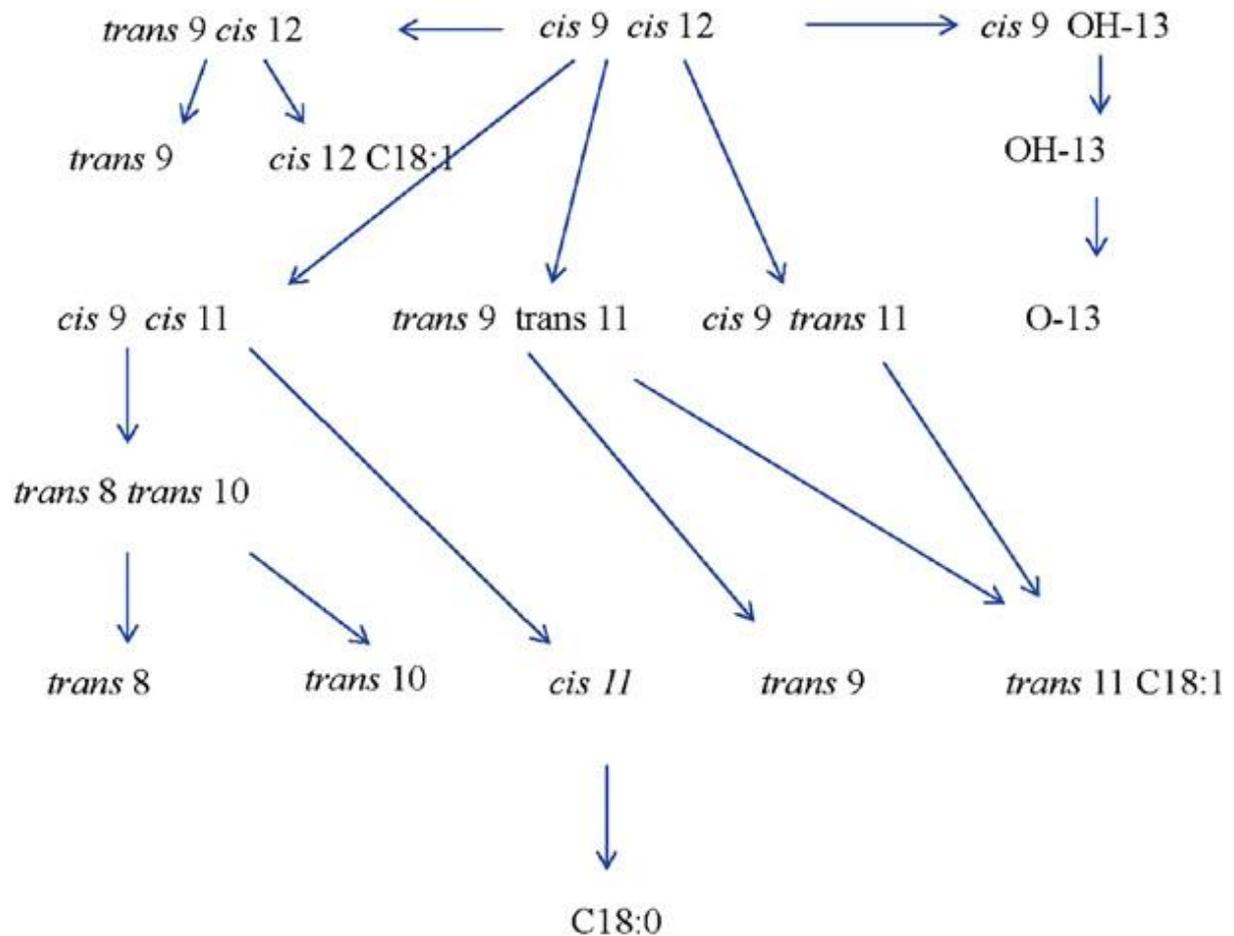


Figura 1. Biohidrogenación del ácido linoleico (Buccioni *et al.*, 2012).

En algunos estudio sobre la biohidrogenación de los ácidos grasos protegidos con jabones cálcicos, tienden a tener una hidrogenación del 47% y 71% cuando las grasas son mezclas de grasa vegetal y animal no protegidas (Wu y Palmquist, 1991). La biohidrogenación de ácidos grasos es relativamente disminuida debido a la falta de degradación de la materia orgánica debido a la presencia de taninos en su estructura y también se reduce parcialmente cuando los taninos condensados son añadidos externamente (Khiaosa

et al., 2009). Una concentración de 7.9% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* afecta parcialmente la biohidrogenación del ácido alfa-linoleico en su etapa final (Khiosa *et al.*, 2009). Por otra parte, un nivel de inclusión de 2% de taninos de quebracho y 2% de aceite no modifica los isómeros de 18:01 y 18:02 pero no existe beneficio para el ácido linoleico conjugado (Toral *et al.*, 2013).

2.4 Biohidrogenación de ácido oleico en estudios *in vitro*

Carriquiry *et al.* (2008) evaluaron la biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos usando cuatro tipos de grasa protegida, grasa animal inerte microcristalizada, linaza más aceite de pescado, aceite de palma (sales cálcicas) y una fuente granulada que contenía ácidos grasos saturados, implicando diferentes concentraciones de ácido oleico 11.4, 11.3, 5.5 y 35.2 para cada dieta, respectivamente; al final de la incubación, la dieta con sales cálcicas resultó la de mayor concentración de ácido oleico.

En el estudio *in vitro* realizado por Buccioni *et al.* (2006) se evaluó la concentración de ácido oleico y CLA a diferentes horarios de incubación, usando aceite de oliva protegido con sales cálcicas 1%, y grasa sin protección (aceite de soya 13.1%); el ácido oleico no fue completamente saturado a ácido esteárico, pero generó otros isómeros 18:1 *cis-trans*. Por su parte, Mosley *et al.* (2002) evaluaron la concentración de ácido oleico en cultivos mixtos de bacterias y reportan que la saturación de ácido oleico no pasa directamente a esteárico si no que se producen isómeros 18:1 *trans* 6-7 y todas las posiciones de 9-16. Para que los microorganismos lleven a cabo esta biohidrogenación se requiere un pH favorable mayor a 6.5, y con valores más bajos, la conversión esteárico incrementa (AbuGhazaleh *et al.*, 2005).

En estudios realizados por Carreño *et al.* (2015) evaluaron diferentes concentraciones de taninos con un nivel de inclusión de aceite de soya (2%) y no hubo efecto para el ácido

oleico cuando los niveles de inclusión fueron de 2 y 4%, con respecto a la dieta testigo, pero niveles de 6% de taninos aumenta el nivel de ácido oleico.

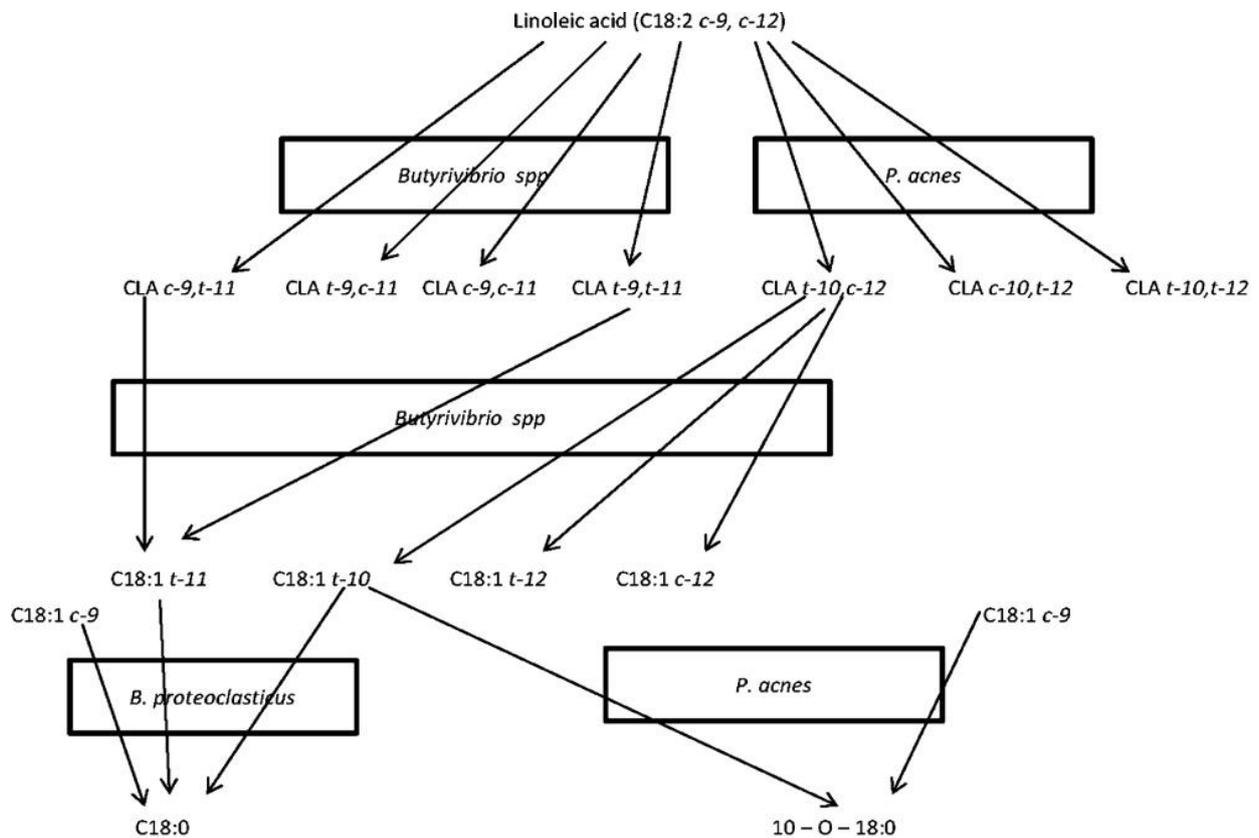


Figura 2. El rol *Butyrivibrio spp.*, *Propionibacterium acnes* y *Butyrivibrio proteoclasticum* sobre el metabolismo de ácidos grasos insaturados linoleico y oleico (Buccioni *et al.*, 2012).

2.5 Importancia de los ácidos grasos insaturados en el humano

La función de las grasas y aceites en la nutrición humana es uno de los temas clave relacionados con la salud. Las grasas y aceites de manera natural contienen ácidos grasos saturados e insaturados, en su mayoría de configuración *cis*. Las funciones fisiológicas de los ácidos grasos saturados y *trans* en los alimentos, tienen relación con la aterosclerosis, el nivel de colesterol en sangre y enfermedades coronarias, lo cual es motivo de preocupación en salud pública (Hayakawa *et al.*, 2000). Sin embargo, se han establecido recomendaciones nutricionales para eliminar ácidos grasos *trans* de la dieta, basado en numerosos estudios

epidemiológicos que relacionan el aumento de riesgo por enfermedad coronaria y el consumo de ácidos grasos *trans* procedentes de alimentos que contienen aceite vegetal hidrogenado (Wang *et al.*, 2012); sin embargo, Hayakawa *et al.* (2000) informan que el consumo de ácidos grasos *trans* proveen del 0.5 a 2.0% del total de energía o su equivalente al consumo de 1.4 a 5.4 g d⁻¹ y de esta cantidad el 70% es de origen animal. Wang *et al.* (2012) en su revisión sugiere un consumo limitado de ácidos grasos *trans*, menor a 1% del total del consumo de energía. En otro estudio, Hayakawa *et al.* (2000) concluyen que el consumo máximo de grasa total debe ser 30% con base al consumo de energía y, que el consumo total de ácidos grasos saturados y *trans* podrían no excederse al 10%, esto puede disminuirse al consumir ácidos grasos saturados de origen animal.

Cuadro 1. Principales fuentes de ácidos grasos insaturados de algunos aceites

Ingrediente	Ácidos grasos insaturados, %		
	Oleico	Linoleico	Linolénico
Aceite de linaza	18.81	15.35	53.46
Aceite de soya	21.78	53.46	7.23
Aceite de girasol	22.37	62.37	0.50
Aceite de colza	56.93	20.30	8.91
Aceite de maíz	25.74	77.22	6.44
Aceite de oliva	77.22	6.44	0.30
Aceite de cacahuate	49.50	26.73	0.0
Oleínas de oliva	74.10	6.18	0.29

FEDNA, 2010.

2.6 Biosíntesis de Taninos

La ruta de proantocianidina y la biosíntesis de antocianinas se relacionan con la biosíntesis de la lignina. La localización intracelular de los intermediarios de la lignina, antocianidina y la biosíntesis de proantocianidina se muestran con las enzimas conocidas: chalcona sintasa (CHS), la chalcona isomerasa (CHI), flavanona-3-hidroxilasa (F3'H), flavanona-3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavanol reductasa (DFR), leucoantocianidina reductasa (LAR), la propuesta de la enzima condensante PA (?), Antocianina sintasa (ANS), flavanol-UDP-glucosil), transferasa (FGT), glutatión-S-transferasa (GST) (Aerts *et al.*, 1999).

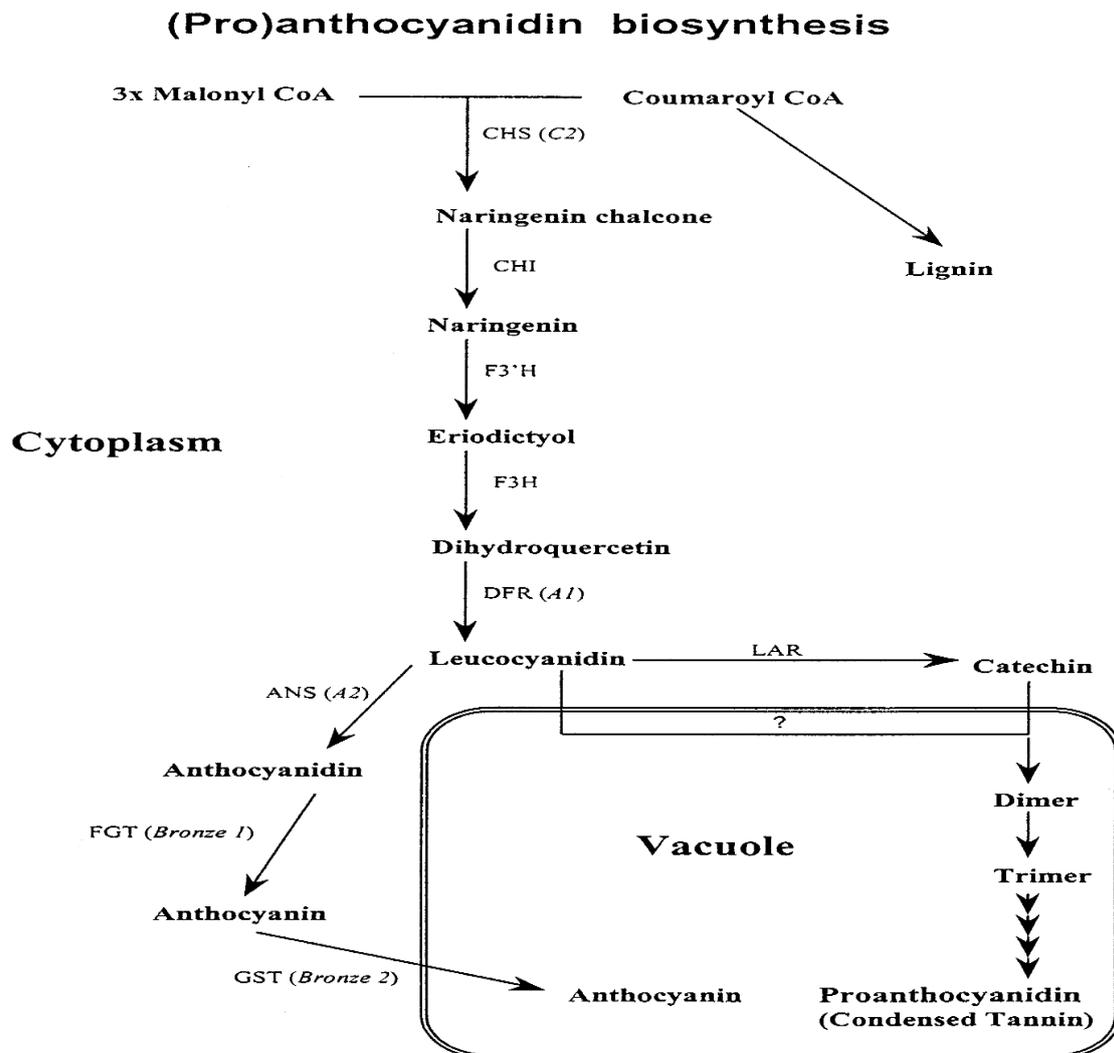


Figura 3. Síntesis de taninos condensados (Aerts *et al.*, 1999).

2.7 Importancia de los taninos en la alimentación de rumiantes

Las proantocianidinas (PA), también conocidos como taninos condensados, pertenecen a metabolitos secundarios más antiguos de las plantas y están muy extendidos en las plantas leñosas, pero también se encuentran en ciertos forrajes, donde se acumulan en diferentes tejidos y órganos para proveer protección contra la depredación; al mismo tiempo, tienen un sabor astringente y son los principales factores de calidad para los cultivos como forrajes (Xie y Dixon, 2005). El rol en el metabolismo de plantas no se conoce, aunque varias hipótesis han sido propuestas, pero los efectos sobre la digestión ruminal son cada vez más claros al blindar la proteína en el rumen, reduciendo la degradación de proteínas y cuando las concentraciones de proteína cruda de la dieta exceden los requerimientos del animal, estos efectos pueden mejorar el rendimiento. Sin embargo cuando las concentraciones de proteína cruda de la dieta son bajas y las concentración de fibra son altos, pueden tener efectos detrimentales (Waghorn, 2008). Forrajes con concentraciones moderadas de taninos condensados (2 a 4 % de MS) ejercer efectos benéficos en el metabolismo de proteínas en ovejas. Por el contrario, concentraciones de 6 a 12% de taninos en la dieta deprimen el consumo voluntario de alimento, la eficiencia digestiva y la productividad animal (Aerts *et al.*, 1999). Los taninos condensados en el follaje de loto de los prados (*Lotus corniculatus*), lotus mayor (*L. pedunculatus*), esparceta, (*Onobrychis viciifolia*) y sulla (*Hedysarum coronarium*) han proporcionado importantes beneficios para la productividad de los rumiantes, la salud y la sostenibilidad ambiental (Waghorn, 2008).

2.7.1 Taninos condensados y su efecto sobre el pH

El estudios realizados por Benchaar *et al.* (2008) donde adicionaron 0.64% de taninos condensados con base al consumo de materia seca, se observó un pH dentro de los valores normales (6.6). Por su parte, Bhatta *et al.* (2009) en un estudio *in vitro* incluyo taninos

hidrolizables y taninos condensados en una relación de 3.94:1.22 y 7.62:3.67%, respectivamente, sin encontrar diferencia en el pH. Dschaak *et al.* (2010), al incluir 3% de taninos en las dietas para vacas lecheras que variaban en su composición, observaron valores de 5.45, 6.50 y 7.07 para pH. Sin embargo, Martin y Jenkis (2002) sugieren que un pH óptimo para llevar a cabo los procesos de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados es por arriba de 6.0, no así cuando el pH está por debajo de 5.5. Así mismo, Mosley *et al.* (2002) evaluaron la concentración de ácido oleico en cultivos mixtos de bacterias y determinaron que los microorganismos llevan a cabo la biohidrogenación con pH favorable superior a 6.5. De manera similar, AbuGhazaleh *et al.* (2005) en un estudio *in vitro* concluyen que el pH por arriba de 6.5 juega un papel importante en la lipólisis y biohidrogenación, especialmente del ácido oleico; no obstante, el establecimiento de estos valores en condiciones *in vivo* estarían sujetas a variaciones diurnas (Nocek, 1992).

2.7.2 Taninos condensados y su efecto sobre nitrógeno amoniacal

Dschaak *et al.* (2010) evaluaron la inclusión 0 y 3% de taninos condensados en la dieta de vacas lecheras, registrando valores de 8.49 y 10 mg dL⁻¹ de N-NH₃ respectivamente. Así mismo, en estudios *in vitro*, se ha relacionado la alta concentración de taninos condensados con una disminución en la concentración de N-NH₃ (Beauchemin *et al.*, 2007; Getachew *et al.*, 2008; Bhatta *et al.*, 2009). Sin embargo, en otro estudio la inclusión de 1% de taninos condensados y 1.7% de aceite de cártamo disminuyó la concentración de N-NH₃ (Toral *et al.*, 2011). Por otra parte, Liu *et al.* (2011) evaluaron concentraciones de 2.5% aceite de coco y niveles de 1 y 3 % de taninos condensados, reportando una concentración de 17.3 mg dL⁻¹ de N-NH₃ para dieta testigo, pero este metabolito disminuyó cuando con 1 y 3 % de taninos condensados (16.37 y 12.36 mg dL⁻¹ de N-NH₃, respectivamente). No obstante, Dschaak *et al.* (2010) en su estudio indican menores pérdidas de nitrógeno ruminal en forma

de N-NH₃ debido a la disminución de degradación de proteína cruda por los microorganismos ruminales en respuesta a la inclusión de taninos condensados. Adicionalmente, Getachew *et al.* (2008) señalan que los taninos de quebracho muestran una fuerte protección de la degradación de proteína ruminal.

2.7.3 Taninos condensados y su efecto en la producción de metano

Uno de los principales gases de efecto invernadero producido por los rumiantes es el metano (CH₄) y los estudios realizados a la fecha incluyen el uso de taninos condensados en la dieta de estos animales para contrarrestar su producción. No obstante, la adición de 2% de taninos condensados en la dieta de ganado bovino productor de carne, no afectó la producción de metano (Beauchemin *et al.*, 2007). Por su parte, Bhatta *et al.* (2009) confirman que los taninos de quebracho y taninos hidrolizables suprimen la metanogénesis directamente a través de su actividad antimetanogénica e indirectamente, al inhibir la actividad de los protozoarios. En este sentido, se reporta que al incluir 3% taninos de castaño se disminuye la producción de CH₄ significativamente y cuando se agrega 2.5% de aceite de coco, la disminución sólo es parcial (Liu *et al.*, 2011). En un meta análisis realizado por Jayanegara *et al.* (2012) con estudios *in vitro*, confirmaron que el incremento del nivel de inclusión de taninos en la dieta (> 2 y ≤ 10%) disminuye de forma significativa la emisión de CH₄.

2.7.4 Taninos condensados y su efecto en la digestibilidad de la MS, FDN y FDA

En estudios relacionados con la digestibilidad *in vitro*, la inclusión de 2.5% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* en dietas de ovinos disminuyó la digestibilidad de materia seca (Carulla *et al.*, 2005). En contraste, otro estudio *in vivo* realizado por Dschaak *et al.* (2010) no reportó diferencias en la digestibilidad de materia seca al incluir 3% de taninos condensado en la dieta de vacas lecheras, lo cual resulta similar a lo reportado por Getachew

et al. (2008) quienes tampoco encontraron diferencias en la digestibilidad de la materia seca cuando se agregó 5% de taninos condensados en un medio *in vitro*, pero cuando la dosificación fue de 10%, la digestibilidad disminuyó. Por otra parte, Ahnert *et al.* (2015) también reportaron disminución en la digestibilidad de la materia seca en ganado lechero cuando se incluyó más de 4% de taninos (extracto de quebracho).

Los efectos relacionados con la disminución de la digestibilidad de la materia seca se explican por la disminución en la fermentación de carbohidratos ruminales, atribuida a la formación de complejos tanino con moléculas de la pared celular que impide la actividad microbiana, haciendo indisponibles los sustratos (McSweeney *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005); así mismo, los taninos pueden inhibir directamente a los microorganismos ruminales blindando su pared celular o disminuyendo la actividad de sus enzimas extracelulares (Scalbert, 1991; Bae *et al.*, 1993). Un ejemplo de complejo tanino-bacteria se presenta en *Fibrobacter succinogenes* al incrementar la actividad de las endoglucanasas extracelulares que son inhibidas por la presencia de taninos (Smith *et al.*, 2005). De acuerdo a lo descrito, la digestión de la FDN y FDA dependerá de la población de bacterias celulolíticas y el aporte de Ahnert *et al.* (2015) indica diferencias significativas en la digestibilidad de la FDN y FDA con el uso de taninos al 4 y 6%, reduciendo en 12.95 y 17.82% la FDN y 13.48 y 20.86 % la FDA, para los niveles de taninos señalados, respectivamente. Adicionalmente, Smith *et al.* (2005) concluye que a concentraciones desde 0.7 a 2% de taninos ya ejercen un efecto sobre la composición de las poblaciones bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el grado de biohidrogenación de ácidos grasos presentes en el aceite de oliva por bacterias ruminales, evaluando la inclusión de taninos en un medio ruminal *in vitro*.

3.2 Objetivos particulares

a) Determinar el perfil de ácidos grasos con niveles crecientes de taninos condensados y aceite de oliva en un medio ruminal *in vitro* a 72 h.

b) Determinar el pH y nitrógeno amoniacal del medio de cultivo con niveles crecientes de taninos condensados y aceite de oliva en un medio ruminal *in vitro* a 72 h.

c) Determinar la concentración de metano (CH₄) con niveles crecientes de taninos condensados y aceite de oliva en un medio ruminal *in vitro* a 72 h

d) Determinar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) a 72 h con niveles crecientes de taninos condensados y aceite de oliva.

e) Determinar la desaparición *in vitro* de la FDN y FDA a 72 h con niveles crecientes de taninos condensados y aceite de oliva

4. HIPÓTESIS

Al incrementar la concentración de taninos condensados y aceite de oliva en condiciones *in vitro* se reduce la biohidrogenación de los ácidos grasos por las bacterias ruminales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 de la carretera México – Texcoco, Montecillo, Estado de México.

5.2 Desarrollo del experimento

Se realizó un experimento *in vitro*, utilizando tres niveles de aceite de oliva y tres niveles de taninos condensados, los nueve tratamientos a evaluar se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos experimentales

Tratamiento, T	Proporción de los componentes para 500 mg de muestra		
	Aceite ¹ , %	Taninos ² , %	Alfalfa ³ , %
T1	0.0	0.0	100.0
T2	0.0	2.5	97.5
T3	0.0	5.0	95.0
T4	2.5	0.0	97.5
T5	2.5	2.5	95.0
T6	2.5	5.0	92.5
T7	5.0	0.0	95.0
T8	5.0	2.5	92.5
T9	5.0	5.0	90.0

¹Aceite de oliva (Oli de Nutrioli Extra Virgen) 74% de ácido oleico ²Tanino Comercial (SILVAFEED ByPro, taninos condensados 387.58 mg g⁻¹ peso seco). ³Alfalfa molida usando una criba de 1 mm de diámetro. T1= 0 mg de aceite, 0 mg de taninos y 500 mg de alfalfa; T2= 0 mg de aceite, 32.25 mg de taninos y 467.76 mg de alfalfa; T3= 0 mg de aceite, 64.50 mg de taninos y 435.50 mg de alfalfa; T4= 12.50 mg de aceite, 0 mg de taninos y 487.53 mg de alfalfa; T5= 12.50 mg de aceite, 32.25 mg de taninos y 455.27 mg alfalfa; T6=12.50 mg de aceite, 64.50 mg taninos y 423.02 mg de alfalfa; T7= 25.0 mg de aceite, 0 mg de taninos y 475.02 mg de alfalfa; T8= 25.0 mg de aceite, 32.25 mg de taninos y 442.76 mg de alfalfa; T9= 25.0 mg de aceite, 64.50 mg de taninos y 410.51 mg de alfalfa.

5.3 Establecimiento del experimento

Se determinó la composición bromatológica de la muestra a incubar de acuerdo a cada tratamiento con base al contenido de materia seca (MS), proteína total (PT), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA). La muestra de alfalfa se molió usando una malla de 1 mm de diámetro, posteriormente se adicionó la cantidad correspondiente de taninos y de aceite según el tratamiento correspondiente. El aceite de oliva se diluyó con etanol a una relación de 25:30 mg mL⁻¹ de aceite:etanol,

5.4 Análisis de materia seca (AOAC, 2005)

Se pesó 1 g de muestra en la balanza analítica OHAUS GA200 y se colocó en un crisol de porcelana Lofivitrex. El crisol con la muestra se colocó en una estufa Felisa 293A a una temperatura de 70 °C durante 24 horas, una vez que se cumplió el horario se retiraron con pinzas y se colocaron en un desecador durante 10 minutos, para posteriormente registrar el peso y determinar el contenido de materia seca (MS) mediante la siguiente fórmula:

$$MS (\%) = \frac{(\text{Peso del crisol} + \text{muestra seca}) - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra seca}} \times 100$$

5.5 Análisis de cenizas

Una vez analizado el contenido de materia seca de las muestras, los crisoles se colocaron en una mufla Lindberg 51894, la temperatura se incrementó de 100 en 100 °C y se incinero a una temperatura final de 600 °C por 12 h, posteriormente los crisoles se retiraron de la mufla cuando la temperatura del interior fue menor a 100 °C y se colocaron en un

dsecador hasta enfriarse para posteriormente, pesarlo y registrar los datos. El contenido de cenizas se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(\text{Peso del crisol} + \text{Peso de crisol más cenizas}) - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra seca}} \times 100$$

5.6 Proteína total (AOAC, 2005)

Se pesaron 300 mg de muestra y se depositaron en un tubo de ensayo Kymax de 73 mL, adicionado con 500 mg de catalizador y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, los tubos con la muestra se colocaron en un bloque de asbesto a una temperatura de 350 °C, donde se dejó digerir la materia orgánica hasta que la mezcla se tornara color verde claro. Después la muestra se depositó en un matraz Erlen Meyer de 50 mL que contenía 6 mL de solución de ácido bórico al 4% y se colocó en el destilador (Labconco) al cual se le agrego 10 mL de hidróxido de sodio y se destiló hasta recolectar 30 mL y se tituló con ácido clorhídrico al 0.1 N hasta virar a color rosa. Para determinar el porcentaje de proteína se estimó el contenido de nitrógeno (N) total utilizó la siguiente fórmula:

$$N (\%) = \frac{(\text{mL de ácido}) (\text{Normalidad del ácido}) (1.4)}{\text{Gramos de muestra húmeda}} \times 100$$

La cantidad de nitrógeno se multiplicó por 6.25 para determinar el contenido de proteína y los resultados se ajustaron a base seca.

5.7 Determinación de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA)

Para la determinación de FDN y FDA se utilizó la técnica descrita por Ankom, (2014ac) Technologies. Se colocó una muestra por duplicado para cada tratamiento pesando

500 mg de muestra seca y se colocó en bolsas ANKOM[®] F57 de 5 x 4 cm, tamaño de poro de 25 µm, fabricadas en poliéster/polietileno con filamentos extruidos en una matriz de tres dimensiones (ANKOM Technologies, Macedón, NY, USA.). Fueron lavadas durante una hora con los detergentes FDN y FDA, según el caso, en ANKOM 200 Fiber Analyzer SKU: A200 A200I, concluyendo el tiempo, se lavaron tres veces, por un tiempo de cinco minutos en cada periodo a una temperatura de 70-90 °C hasta que el remanente de detergente se eliminará, después se colocaron en un vaso de precipitado que contenía 200 mL de acetona por cinco minutos. Posteriormente se colocaron en una charola recubierta de papel para su secado, una vez secas se colocaron en la estufa a 70 °C por 24 h, finalmente se retiró de la estufa con pinzas y se colocó en un desecador, se pesó la muestra y se registró el peso seco. El mismo procedimiento se aplicó para determinar FDN y FDA.

Para calcular FDN se usó la siguiente formula:

$$FDN (\%) = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{(W2)} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa.

W2= Peso de la muestra.

W3= Peso seco de la bolsa con la muestra después de la extracción.

C1= Corrección por blanco (peso seco final de la bolsa/ peso original de la misma bolsa).

Para calcular FDA se usó la siguiente formula:

$$FDA (\%) = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{(W2)} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa.

W2= Peso de la muestra.

W3= Peso seco de la bolsa con fibra después de la extracción.

C1= Corrección por blanco (peso seco final de la bolsa/peso inicial de la bolsa en blanco).

Cuadro 3. Composición química de los sustratos con niveles crecientes de inclusión de aceite de oliva y taninos de quebracho

Componente	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
	-----			%	-----				
Materia Seca	92.3	92.2	92.7	92.3	92.6	91.9	93.2	92.6	92.7
Proteína	21.4	20.3	18.5	20.9	19.6	18.1	20.7	18.9	17.5
Cenizas	10.0	9.6	8.9	10.2	9.3	8.9	9.4	9.1	8.5
FDN	40.3	39.4	36.2	41.4	39.0	36.5	39.8	38.4	35.7
FDA	28.4	28.2	25.5	28.3	26.8	24.9	27.9	26.5	24.6

Perfil de ácidos grasos

	Alfalfa	Aceite de oliva
	--- mg 100 mg ⁻¹ de ácidos graso ---	
Láurico (C12:0)	0.558	--
Mirístico (C14:0)	0.976	--
Pentadecanoico (15:0)	0.851	--
Palmítico (C16:0)	28.98	13.14
Palmitoleico (C16:1)	3.230	1.280
Heptadecanoico (C17:0)	0.641	0.102
Estearico (C18:0)	4.320	4.310
Elaídico (C18:1 Trans-9)	0.460	--
Oleico (C18:1)	2.540	74.55
Linoleico (18:2)	19.69	4.900
Araquidónico (C20:0)	0.504	0.509
Eicosaenoico (C20:1 Cis 11)	---	0.370
Linolénico (C18:3)	36.60	0.811

¹Aceite de oliva (AO, Oli de Nutrioli Extra Virgen) 74% de ácido oleico ²Taninos condensados de quebracho (TC, SILVAFEED ByPro, taninos condensados 387.58 mg g⁻¹ peso seco). ³Alfalfa molida (Al) usando una criba de 1 mm de diámetro.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

5.8 Análisis de taninos condensados

Se siguió el método propuesto por Makkar (2003). De la muestra se pesaron 25 mg por triplicado en tubos de plástico de 15 mL, añadiéndose 10 mL de acetona al 70% (vol/vol). Los tubos con tapa se incubaron en baño de ultrasonido por 10 min, después se apagó por 5 min y posteriormente se encendió por otros 10 min. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colocó en hielo para su uso inmediato.

5.8.1 Determinación de fenoles totales

Para determinar la concentración de taninos totales, primero se determinó el contenido de fenoles totales utilizando el método con el reactivo de Folin-ciocalteu. En tubos de ensaye de vidrio de 100 x 120 mm se colocaron 500 μ L de carbonato de sodio al 20%, después de 60 min se leyeron en el espectrofotómetro a 725 nm. Para construir la curva estándar se utilizó una solución de ácido tánico fresca (Merck®) a 0.1 mg mL⁻¹ de concentración.

5.8.2 Remoción de los taninos de los extractos con acetona

En tubos de plástico de 15 mL se pesaron 100 mg de polivinil pirrolidona (PVPP) insoluble (Sigma-Aldrich), se añadieron 1 mL de agua bidestilada y 1 mL del extracto de taninos, manteniendo siempre en hielo, se agitó vigorosamente en el vórtex. Los tubos se almacenaron en refrigeración a 4 °C por 15 min y se volvieron a agitar. Posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colectó y colocó en tubos enfriados en hielo. Para la lectura en el espectrofotómetro se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se procedió de la misma forma que con los sobrenadantes en la determinación de fenoles totales.

5.8.3 Determinación de taninos totales

El resultado final del contenido de taninos totales, se obtuvo restando el contenido de fenoles simples (no taninos), menos el contenido de fenoles totales.

5.9 Producción de gas *in vitro*

5.9.1 Obtención de líquido ruminal

Para la recolección del líquido ruminal se utilizaron dos toros canulados de la raza Holstein, con edad aproximada de 2.5 años, su alimentación fue a libre acceso y constó de alfalfa achicalada como única fuente de alimento, la extracción del líquido se realizó mediante una bomba de vacío eléctrica, que consiste en un compresor de aire de 250 psi y un motor alimentado con 12 volts (MIKEL´S®). La extracción de líquido ruminal se colectó de diferentes partes del rumen, una vez lleno el matraz, el líquido fue filtrado a través de tela velo de novia y un colador de plástico, finalmente se colocó el líquido en un termo de plástico (Colleman®) que contenía agua a 39 °C y fue trasladado al laboratorio de Nutrición Animal.

5.9.2 Preparación del inóculo

El buffer mineral (Cuadro 4) empleado en este experimento fue elaborado de acuerdo a lo descrito por Menke *et al.* (1979). La solución macromineral y micromineral, así como la solución reductora (Cuadro 5), se prepararon un día antes del montaje de la técnica y se colocaron en un baño maría (Felisa Thermo Baño) a una temperatura de 39 °C. Al momento de establecer la técnica, se mezclaron las soluciones en una olla de 10 L que se colocó sobre una platina magnética (Thermo Scientific Cimarec Mod. SP131635) para mantener una temperatura de 39 °C, se agitó manualmente para asegurar que los componentes se mezclaran

completamente. Una vez preparada la solución, se le agregó agua destilada y el líquido ruminal estuvo con flujo constante de CO₂.

5.9.3 Preparación de los viales

Se utilizaron viales serológicos de 120 mL transparentes, a cada vial se le agregó 0.5 g de muestra de acuerdo al tratamiento correspondiente (Cuadro 2), esto se realizó por triplicado, posteriormente se les adicionaron a cada tubo 50 mL de inóculo, así como flujo constante de CO₂ para mantener la anaerobiosis. Los viales se sellaron herméticamente con tapones de neopreno y un arillo de aluminio de 2 cm (Wheaton®), posteriormente fueron colocados en incubación dentro de un baño maría (Felisa Thermo Baño) a 39°C, se cubrió el baño maría con un plástico negro para mantener los frascos protegidos de la luz directa.

5.9.4 Medición de gas

Para determinar las lecturas de gas se utilizó un aparato de desplazamiento de agua (Fedorak y Hrudey, 1983), diseñado con un soporte universal, un embudo cónico y una bureta de 100 mL y dos mangueras de látex de aproximadamente 1 m y 50 cm de longitud, respectivamente, y de 3/8 de pulgada de diámetro. Las lecturas se realizaron con los horarios establecidos de 24, 48 y 72 h de incubación, para ello los tapones fueron punzados con una aguja calibre 18G x 1^{1/2} (BD Precision Glide) y se midió la producción de gas por desplazamiento de agua en la bureta.

Cuadro 4. Componentes de la técnica de gas *in vitro*

Solución Buffer	Concentración
Bicarbonato de Amonio (g) (Fisher)	4.16
Bicarbonato de Sodio (g) (Sigma)	36.40
Agua destilada hasta (mL)	1,040
Macro mineral (mL)	
Fosfato de Sodio Dibásico (g)	5.93
Fosfato de Potasio Monobásico (g) (sigma)	6.44
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (g)	0.624
Agua destilada hasta (mL)	1,040
Micro mineral (mL)	
Cloruro de Calcio Dihidratado (g) (Sigma)	13.2
Cloruro de Manganeso Tetrahidratado (g) (Sigma)	10
Cloruro de Cobalto Hexahidratado (g) (Sigma)	1
Cloruro Ferrico (g) (Sigma)	8
Agua destilada hasta (mL)	100
Indicador Oxido-reducción	
Resazurina 0.1 % (mL) (Sigma)	5.35
Solución reductora (mL) a razón de 2 mL a 60 mL de inculo	
Sulfato de Sodio Anhidrido (Na ₂ SO ₄) (g) (Sigma)	1.187
NaOH 0.1 N	8.33
Agua destilada hasta a (mL)	208.3

Cuadro 5. Componentes totales de la técnica gas *in vitro*

	Preparé	Vial	Frascos	Buffer Total	Líquido ruminal	Solución reductora	Inoculo total
Valores	mL	mL	Totales	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)
Rumen buffer	1,040	50	125	4,166.6	2,083.3	208.3	6,458
Sol. Macro mineral	1,040						
Sol. Micro mineral	0.53						
Resarzurina	5.35						
Agua destilada	2,080.3						
Buffer Total	4,166.6						

5.10 Producción de Biogás (CH₄)

Se utilizó la técnica de gas *in vitro* descrita por Menke *et al.* (1979), se pesó 500 mg de la muestra en base seca y se colocaron en viales serológicos de 120 mL transparentes, a los cuales se les adicionaron 50 mL de la solución buffer, los viales fueron sellados con tapones de neopreno azul y arillos de aluminio (Wheaton®), y colocados en incubación a una temperatura de 39 °C en baño maría.

5.10.1 Trampa de captura de biogás

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizaron viales serológicos de 120 mL, transparentes los cuales se llenaron con una solución salina saturada acidificada a $\text{pH} \leq 2$, la cual consistió en 370 g de sal (la fina®) (NaCl) y 0.01 g de naranja de metilo disueltos en un litro de agua destilada, una vez mezclados la solución se ajustó a pH de 2 con HCl 1N.

5.10.2 Medición de metano (CH₄)

Se siguió la misma metodología para la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Menke *et al.* (1979), se liberó el gas de los viales serológicos a las 24 y 48 h, y se capturó el gas a 72 h. La técnica de captura de biogás se realizó colocando la aguja calibre 18G x 1^{1/2} (BD Precision Glide) en el vial de solución salina saturada que previamente fue identificado y posteriormente se pinchó el vial con solución salina con la aguja vacutainer, quedando una aguja expuesta con la que posteriormente se pinchó el vial donde se llevó a cabo la fermentación. El desplazamiento de solución salina saturada fue colectado en una bureta de 50 mL y se registró el volumen (mL) desplazado para su análisis.

5.11 Determinación del perfil de ácidos grasos

La técnica empleada en este estudio se modificó de los autores Li y Watkins (2001), Palmquist y Jenkins (2003), Jenkins (2010) y Cesaro *et al.* (2013). Los viales de 120 mL que contenían las muestras remanentes utilizados en el ensayo de producción de gas *in vitro* se colocaron en una liofilizadora (Labconco Freezone) programada a una temperatura menor a -52 °C. Se pesaron 500 mg de muestra por duplicado y se colocaron en tubos de polipropileno de 20 × 150 mm. Se Añadieron 3 ml de metóxido de sodio 0.5 en Metanol (Sigma Aldrich, # Cat. 403067) con una pipeta volumétrica, se taparon los tubos y se mezclaron lentamente en el vórtex, después se colocaron en baño maría a 50 °C durante 10 min. Se aflojo ligeramente el tapón para eliminar el gas originado por la reacción, se retiraron del baño y se dejaron enfriar por 5 min. Se agregaron 3 mL de HCL metanólico al 5 % (1.37 M) (Sigma Aldrich, # Cat. 33355). Posteriormente se cerraron los tubos herméticamente y se agitaron con precaución en el vórtex. Se incubó en baño maría a una temperatura entre 73 y 76 °C durante 13 min. Concluida esta etapa se aflojaron un poco los tapones para evitar la expulsión de estos

por presión de la reacción. Se removieron los tubos del baño maría y se dejaron enfriar por 7 min. Se agregaron 2 mL de hexano y de forma paulatina 5 mL de K_2CO_3 al 6 % o (0.43 M). Nuevamente se agito en vórtex y se centrifugó (Beckman J2-HS Centrifuge) a 9071 g x 5 minutos para separar las capas del disolvente. Se transfirió el estrato superior (disolvente orgánico) a un tubo de polipropileno (13 x 100 mm), se agregaron 500 mg de sulfato de sodio (100 mg de carbón vegetal sólo cuando la muestra estaba muy colorida) para el disolvente orgánico. Nuevamente se agitó en vórtex y se centrifugó a 9071 g x 5 minutos. Posteriormente se transfirieron 2 mL de la capa del solvente en jeringas de 3.5 mL con la ayuda de la micro pipeta; las jeringas en la salida contenían microfiltros (TITAN®-17mm- Nylon – 0.45 μ m), el solvente fue colocado en viales para cromatografía de gases. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Hp 6890 series Packerd GC System plus con condiciones establecidas de temperatura de inyector de 250 °C, Split 10.0%, utilizando como gas acarreador Helio (He), temperatura de horno de 250 °C, detector de ionización de flama de 260 °C, flujo de aire 330, flujo de H_2 , columna SPTM- 2560. 100 m X 0.25 mm ID, 0.20 μ m film, utilizando como estándar SupelcoTM 37 Componente FAME mix (Sigma Aldrich, # de Cat. CRM47885)

5.12 Determinación de pH

Una vez concluida la fermentación de gas *in vitro* a 72 horas los frascos fueron destapados para medir el pH directamente de los viales con un potenciómetro de la marca Orion, modelo 250A que fue calibrado previamente a pH de 4 y 7.

5.13 Determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

Para esta determinación se utilizó la técnica de McCullough (1967), la cual consistió en colocar 4 mL del medio de cultivo en tubos de ensaye de 13 X 100 mm, se agregó 1 mL de ácido metafosfórico (solución al 25 %), se centrifugó a 12,879 g x 10 min. Del sobrenadante se utilizaron 20 µL para posteriormente depositarlos en tubos de ensaye de 13x10 mm, a los cuales se les adicionó 1 mL de fenol, 1 mL de hipoclorito de sodio, se incubó a 39 °C a baño maría durante 30 min y por último se agregaron 5 mL de agua destilada; posteriormente las muestras fueron leídas a 630 nm en un espectrofotómetro Cary 1-E, Uv- Visible Marca VARIAN.

5.14 Determinación de biogás (CH₄)

Para estimar la producción de CH₄ se extrajeron 200 µL de muestra de gas con una Jeringa (Gastight ® # 1001) provista de una aguja hipodérmica DL 23G x 25 mm que posteriormente se inyectó en la septa del canal correspondiente al cromatógrafo de gases adaptado al metanizador (Perkin Elmer Instruments Autos system XL) bajo las siguientes condiciones: inyector de temperatura 200 °C, detector de temperatura 200 °C y flujo de 7.2 psi, utilizando nitrógeno a 50 °C como gas acarreador. Se utilizó una columna capilar Elite Series ® GMC Elite Plot Q 30 m x .53 m, un detector de ionización de flama (FID) a 200 °C, un inyector a 200 °C, temperatura de horno de 50 °C y un tiempo de corrida de 5 minutos.

Los resultados se calcularon bajo la siguiente fórmula:

Ecuación de los gases ideales: $PV = nRT$

Donde:

P = Presión en atmósferas (atm). Una atm es igual a 760 mm de Hg.

R = Constante molar de un gas = 0.0821 L·atm/ (K·mol)

V = Litros

T = Temperatura en grados Kelvin (Temperatura absoluta = 273 + grados Celsius de la prueba).

5.15 Degradación *in vitro* de la materia seca

La digestibilidad verdadera de la materia seca (DIVMS) se realizó por el método *in vitro* utilizando el Incubador Daisy Ankom, modelo D200 (Ankom, 2014b) Technologies. Se utilizaron 500 mg base seca de muestra que fueron colocadas en las bolsas Ankom F57 de 5 x 4 cm, tamaño de poro de 25 μm y fabricadas de poliéster/polietileno con filamentos extruidos en una matriz de tres dimensiones (Ankom Technologies, Macedon, NY, USA.). El horario de incubación fue de 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 y 72 h, utilizándose una mezcla de líquido ruminal de dos toros de raza Holstein de peso aproximado de 400 a 450 kg, fistulados ruminalmente, alimentados con alfalfa.

Para el cálculo de la degradación de la materia seca se utilizó la siguiente formula:

$$DIVMS = \frac{100 - (W3 - (W1 \times C1))}{(W2 \times DM)} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa.

W2= Peso de la muestra.

W3= Peso final después de la secuencia *in vitro*.

C1= Factor de corrección de la bolsa blanco.

5.16 Digestibilidad *in vitro* de FDN y FDA

Para la determinación de FDN y FDA en las muestras remanentes después de la incubación *in vitro* se utilizó la técnica descrita por Ankom, (2014ac) Technologies. Las bolsas fueron lavadas durante una hora en ANKOM 200 Fiber Analyzer SKU:A200 A200I con solución fibra detergente neutra (FDN), concluyendo el tiempo fueron enjuagadas tres veces por un tiempo de cinco minutos en cada periodo a una temperatura de 70 a 90 °C hasta que el remanente de detergente se eliminará; después fueron colocadas en un vaso de precipitado que contenía 200 mL de acetona y se dejaron por cinco minutos. Posteriormente se colocaron en una charola recubierta de papel para su secado; una vez secas se colocaron en la estufa a 70 °C por 24 h; finalmente se retiraron de la estufa con pinzas y se colocaron en un desecador, se pesó la muestra y se registró, se realizó el mismo proceso para determinar FDA.

Para calcular FDN se usó la siguiente formula:

$$FDN = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{(W2)} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa.

W2= Peso de la muestra.

W3= Peso seco de la bolsa con la muestra después de la extracción.

C1= Corrección por blanco (peso seco final de la bolsa/ peso original de la misma bolsa).

Para calcular FDA se usó la siguiente formula:

$$FDA = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{(W2)} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa.

W2= Peso de la muestra.

W3= Peso seco de la bolsa con fibra después de la extracción.

C1= Corrección por blanco (peso seco final de la bolsa/peso inicial de la bolsa en blanco).

5.17 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3, con tres niveles de aceite de oliva (0, 2.5 y 5 %) y tres niveles de taninos condensados totales (0, 2.5 y 5 %), los datos se analizarán mediante el procedimiento PROC GLM de SAS 9.1 (SAS, 2004). Las medias de los tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Perfil de ácidos grasos

El Cuadro 6 presenta el perfil de ácidos grasos a 72 h pos incubación *in vitro* de alfalfa con niveles crecientes de oleico y de taninos condensados. Con base al análisis estadístico, se pueden apreciar diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos originados por la aplicación de los niveles crecientes de oleico, de taninos, y por la interacción de estos factores. La concentración de ácido oleico se incrementó ($P < 0.05$) a medida que se aumentaron los niveles de aceite y de taninos condensados, explicándose por un incremento lineal del aporte de este ácido graso a través del aceite de oliva y por su protección mediante la adición de taninos condensado. Los niveles más altos ($P < 0.05$) de linoleico y linolénico se encuentran en el tratamiento T3 (5% de taninos), observándose valores de 8.51 y 7.47 mg 100 mg⁻¹, para linoleico y linolénico, respectivamente. Cuando se incrementan los niveles de aceite y taninos se registraron los niveles más bajos ($P < 0.05$) de linoleico (T7, T8 y T9) y linolénico (T8). Esta disminución se explica por una menor inclusión de forraje en los tratamientos implicados, el cual es rico en estos ácidos grasos poliinsaturados y muestran un comportamiento opuesto a la concentración del ácido oleico, el cual se incrementó conforme aumentó el nivel de aceite en los tratamientos.

En un estudio *in vitro*, AbuGhazaleh *et al.* (2005) reportaron que para llevar a cabo el proceso de biohidrogenación del ácido oleico se requiere de un pH favorable mayor a 6.5, en este estudio el pH fue superior al mencionado para todos los tratamientos. Por otra parte, Carreño *et al.* (2015) evaluaron diferentes concentraciones de taninos de quebracho (0, 2, 4, 6 y 8%) y un nivel de inclusión de aceite de soya (2%), señalando que no hubo cambios en la concentración del ácido oleico, con respecto a la dieta testigo, cuando los niveles de inclusión de taninos fueron de 2 y 4 %, pero la concentración de este ácido cambió cuando se incluyó

más de 6% de taninos. Algo similar ocurrió en nuestro estudio con niveles de inclusión de 0, 2.5 y 5% de taninos condensados, donde no hubo cambios ($P < 0.05$) en la concentración de ácido oleico; sin embargo, conforme se incrementó el nivel de aceite de oliva las concentraciones de ácido oleico fueron aumentando gradualmente y se mantuvieron libres al proceso de biohidrogenación gracias a la protección de los taninos condensado. A medida que se disminuye la saturación de oleico se incrementa ($P < 0.05$) gradualmente la concentración del ácido elaídico, encontrando valores de 2.74 a 3.60, 3.70 a 3.80 y 3.72 a 5.29 mg 100 mg⁻¹ cuando el nivel de aceite de oliva fue de 0, 2.5 y 5%, respectivamente. En el estudio *in vitro* realizado por AbuGhazaleh *et al.* (2005), cuando evaluaron el nivel de aceite de 5% en el medio, reportan que en el proceso de saturación del ácido oleico, no pasa directamente a esteárico, si no que surgen isómeros 18:1 *trans* 6-7 y todas las posiciones de 9-16, particularmente con mayor concentración ácido elaídico. Con respecto a la concentración de ácido esteárico, se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos conforme se incrementa el nivel de taninos y aceite en el medio, de esta manera el nivel de esta ácido incrementó de 11.53 y 25.96 mg 100 mg⁻¹ para el tratamiento testigo (T1) y T9 (5% de aceite y 5% taninos), respectivamente.

Cuadro 6. Perfil de ácidos grasos (mg 100 mg⁻¹ del total de ácidos grasos) a 72 h pos incubación *in vitro* de alfalfa con niveles crecientes de aceite de oliva y de taninos condensados

Ácido graso	Tratamientos									Probabilidad			
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	Pa	Pt	Pa*Pt	EEM
Caproico	3.18 ^a	1.97 ^c	1.68 ^d	3.12 ^a	2.45 ^b	2.35 ^b	2.34 ^b	1.69 ^{cd}	1.44 ^d	<.0001	<.0001	0.0003	0.0720
Láurico	2.38 ^a	1.48 ^d	1.46 ^d	2.01 ^b	1.43 ^d	1.03 ^e	1.78 ^c	1.33 ^d	1.02 ^e	<.0001	<.0001	0.0002	0.0416
Mirístico	5.74 ^a	4.12 ^c	4.03 ^c	5.07 ^b	3.46 ^d	2.83 ^e	3.75 ^{cd}	2.91 ^e	2.34 ^f	<.0001	<.0001	0.0012	0.1139
Descdo1	4.34 ^a	3.54 ^b	3.43 ^b	4.27 ^a	3.51 ^b	3.12 ^{bc}	4.02 ^a	2.76 ^{cd}	2.34 ^d	<.0001	<.0001	0.0120	0.1188
Descdo2	8.10 ^a	6.80 ^{ab}	7.48 ^{ab}	7.12 ^{ab}	7.06 ^{ab}	6.25 ^{ab}	6.71 ^{ab}	4.55 ^b	4.57 ^b	0.0059	0.0717	0.4616	0.8900
Pentadecanoico	5.08 ^a	4.70 ^{ab}	4.59 ^{bc}	4.80 ^{ab}	4.22 ^{cd}	4.13 ^{de}	4.56 ^{bcd}	3.76 ^{ef}	3.37 ^f	<.0001	<.0001	0.0388	0.1099
Palmítico	36.13 ^a	33.96 ^{ab}	33.86 ^{ab}	31.22 ^{bc}	31.28 ^{bc}	30.76 ^{bc}	31.49 ^{bc}	30.55 ^{bc}	29.31 ^c	<.0001	0.0385	0.4454	0.9243
Palmitoleico	2.20 ^a	2.04 ^a	2.08 ^a	2.06 ^a	2.03 ^a	2.13 ^a	1.48 ^b	1.54 ^b	1.65 ^b	<.0001	0.0918	<.0001	0.0598
Heptadecanoico	1.43 ^a	1.52 ^a	1.52 ^a	1.18 ^{bc}	1.25 ^b	1.50 ^a	1.05 ^c	1.04 ^c	1.08 ^c	<.0001	0.0003	0.0026	0.0385
Estearico	11.53 ^e	18.19 ^{cd}	17.70 ^d	18.49 ^{cd}	20.14 ^{bc}	21.73 ^b	18.23 ^{cd}	24.77 ^a	25.96 ^a	<.0001	<.0001	0.0004	0.5457
Elaídico	2.74 ^c	3.65 ^b	3.60 ^b	3.70 ^b	3.79 ^b	3.80 ^b	3.72 ^b	5.19 ^a	5.29 ^a	<.0001	<.0001	<.0001	0.1145
Oleico	1.93 ^d	2.19 ^d	2.34 ^d	6.44 ^c	6.18 ^c	6.37 ^c	9.26 ^a	7.79 ^b	9.59 ^a	<.0001	<.0001	<.0001	0.1343
Linoleico	6.75 ^c	7.62 ^b	8.51 ^a	4.14 ^e	5.96 ^d	6.16 ^{cd}	4.09 ^e	4.38 ^e	4.57 ^e	<.0001	<.0001	0.0002	0.1627
Araquidónico	0.978 ^a	0.961 ^a	0.652 ^c	0.586 ^{cd}	0.463 ^e	0.430 ^e	0.860 ^b	0.828 ^b	0.559 ^d	<.0001	<.0001	<.0001	0.0187
Linolénico	6.21 ^c	6.71 ^b	7.47 ^a	2.75 ^e	4.82 ^d	6.18 ^c	2.66 ^e	5.11 ^d	5.77 ^c	<.0001	<.0001	<.0001	0.1122

AO= Aceite de oliva, TC= Taninos condensados y Al= alfalfa.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

^{a,b,c}. Valores con distinta literal en una columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

6.2 pH

Incrementar el nivel de taninos condensados y aceite de oliva en los medios de cultivo, no tuvo efecto ($P < 0.05$; Cuadro 7) en los valores de pH a las 72 h de incubación. De manera similar, en un estudio realizado por Benchaar *et al.* (2008) donde se adicionó 0.64% de taninos condensados, se determinó que el pH (6.68) no cambió con respecto al registrado en la dieta testigo (6.66). En otro estudio *in vivo* realizado por Toral *et al.* (2011), la inclusión de 2% de aceite de cártamo y 1% de taninos (combinando 1:1 taninos condensados y taninos hidrolizables) no ejerció efecto en el pH cuando se comparó con la dieta testigo (6.76 vs 6.76 dieta testigo y dieta con taninos, respectivamente). Otro estudio *in vitro* de donde combinaron taninos hidrolizables en forma de galotanino y taninos condensados de quebracho, 3.94:1.33% y 7.62:3.67%, respectivamente, reporta valores de pH 6.68 y 6.68, para cada combinación respectivamente, sin efecto en esta variable (Bhatta *et al.*, 2009). De forma similar, Dschaak *et al.* (2010), señalaron que independientemente del nivel de forraje en la dieta, la inclusión de 3% de taninos condensados no influye sobre el pH ruminal de ganado lechero.

Sin embargo, Martin y Jenkis (2002) sugieren que un pH óptimo para llevar a cabo los procesos de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados es por arriba de 6.0, no así cuando el pH está por debajo de 5.5. Así mismo, AbuGhazaleh *et al.* (2005) en un estudio *in vitro* concluyen que el pH por arriba de 6.5 juega un papel importante sobre la lipólisis y biohidrogenación, especialmente del ácido oleico, pero para establecer estos valores en condiciones *in vivo*, están sujetas a condiciones de variaciones diurnas (Nocek, 1992).

6.3 Nitrógeno amoniacal

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) determinada a 72 h de incubación *in vitro* de alfalfa con niveles crecientes de aceite de oliva y taninos condensados se presentan en el Cuadro 7. La comparación de medias permiten detectar cambios (P<0.05) entre tratamientos, donde el tratamiento testigo (T1) presentó el valor más alto (P<0.05) para esta variable (12.9 mg dL⁻¹ de N-NH₃) y cuando se agregó el nivel de taninos condensados más alto (5%) se registró la concentración de amonio más baja (P<0.05) (4.39 y 4.49 mg dL⁻¹ de N-NH₃ para T6 y T9, respectivamente).

Congruente con los resultados de esta investigación, estudios realizados por Dschaak *et al.* (2010), donde evaluaron la inclusión de 0 y 3% de taninos condensados en la dieta de ganado lechero, concluyeron que la concentración de N-NH₃ tiende a disminuir conforme se incrementa el nivel de taninos condensados; así mismo, otras investigaciones han determinado el mismo patrón, al disminuir la concentración de N-NH₃ conforme se incrementa el nivel de taninos condensados en sistemas *in vitro* (Getachew *et al.*, 2008; Bhatta *et al.*, 2009), explicándose por la disminución en la actividad enzimática de los microorganismos ruminales, que se traduce en una menor degradación de la proteína y en una reducida liberación del grupo amino. Al respecto, Beauchemin *et al.* (2007) reporta que la digestibilidad aparente de la proteína cruda disminuye linealmente de 5 a 15%, cuando el nivel de taninos condensados cambia de 1 a 2%. De manera similar, en un estudio con ovejas donde se evaluaron concentraciones de taninos de 1 y 3% en la dieta, la concentración de amonio disminuyó de 167.7 a 128.5 mg L⁻¹. En este sentido, Dschaak *et al.* (2010) en su estudio indica que gracias a la inclusión de taninos condensados en la dieta, el nitrógeno ruminal se pierde menos en forma de N-NH₃ debido a la disminución de la degradación de

proteína cruda por los microorganismos ruminales, y es que los taninos condensados muestran una fuerte protección de la degradación de proteína ruminal (Getachew *et al.*, 2008).

6.4 Producción de biogás metano

Los resultados para metano (CH₄) bajo los tratamientos evaluados a 72 h de incubación se resumen en el Cuadro 7. Se registraron cambios (P<0.05) entre tratamientos, donde el tratamiento testigo (T1) presentó el valor más alto (P<0.05) para esta variable (0.3608 mMol de CH₄) y cuando se agregó 5% de taninos condensados se registró la concentración de metano más baja (P<0.05) (0.2243 y 0.2337 mMol de CH₄ para T6 y T9, respectivamente).

Aunque algunas investigaciones confirman que los taninos condensados y los taninos hidrolizables galotaninos suprimen la metanogénesis directamente a través de su actividad antimetanogénica e indirectamente al suprimir la actividad de los protozoarios (Bhatta *et al.*, 2009), está documentado que la concentración de estos factores es la que determina el grado de supresión de este gas. En un estudio realizado por Beauchemin *et al.* (2007) donde el nivel de taninos condensados fue de 2% de la dieta ganado de carne, no encontraron efecto en la reducción de metano. Pero cuando el nivel de taninos condensados se incrementó a 3%, disminuye la producción de CH₄, al igual que cuando se agregó 2.5% aceite de coco (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, Jayanegara *et al.* (2012), mediante un metaanálisis confirman que el incrementó en el nivel taninos condensados > 2 a ≤ 10% en la dieta lleva a una disminución de las emisiones de CH₄ ruminal, y esto se explica por un decremento en las poblaciones de bacterias metanogénicas y protozoarios (Liu *et al.*, 2011).

Cuadro 7. Determinación de nitrógeno amoniacal, gas metano (CH₄) y pH a 72 h pos incubación *in vitro* de alfalfa con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados

Tratamientos	pH	N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	CH ₄ , mMol
T1	6.78 ^a	12.93 ^c	0.3608 ^a
T2	6.80 ^a	9.22 ^f	0.3269 ^b
T3	6.81 ^a	4.71 ^g	0.2585 ^d
T4	6.76 ^a	13.96 ^b	0.3252 ^b
T5	6.80 ^a	9.56 ^e	0.2768 ^c
T6	6.80 ^a	4.39 ^h	0.2243 ^e
T7	6.73 ^a	14.52 ^a	0.3268 ^b
T8	6.77 ^a	9.67 ^d	0.2711 ^{cd}
T9	6.80 ^a	4.49 ^h	0.2337 ^e
Pa	0.66	<.0001	<.0001
Pt	0.35	<.0001	<.0001
Pa*Pt	0.98	<.0001	0.0004
EEM	0.075	0.1353	0.0099

AO= Aceite de oliva, TC= Taninos condensados y Al= alfalfa.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

^{a,b,c}. Valores con distinta literal en una columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

6.5 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca de alfalfa a diferentes horarios de incubación, con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados, se presenta en el Cuadro 8. Con base en el análisis estadístico, se registraron cambios ($P < 0.05$) por efecto de adición de aceite de oliva, taninos condensados y la interacción de estos factores, en los tratamientos evaluados y a los diferentes horarios de incubación. Al final de la incubación (72 h), los tratamientos T1, T4 y T7 presentaron el nivel más alto ($P < 0.05$) de digestibilidad de la materia seca, observándose que en común estos tratamientos no contenían taninos condensados. En contraste, los tratamientos T6, T8 y T9, que contenían taninos condensados y en dos de estos, los niveles más altos, presentaron la digestibilidad de la materia más baja ($P < 0.05$) a las 72 h de incubación.

Congruente con estos resultados, Duckett y Gillis (2010) reportan que la digestibilidad aparente ruminal no fue afectada al incluir 4% de aceite de canola, rico en oleico. En su estudio, Carulla *et al.* (2005) reportan que la inclusión de 2.5% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* en dietas para ovinos disminuyó la digestibilidad de materia seca. Por otra parte, en un estudio *in vitro*, Getachew *et al.* (2008) adicionaron taninos condensados a los medios de cultivo, determinando que niveles de 10% de estos compuestos disminuye la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, Ahnert *et al.* (2015) reportaron diferencias en esta variable cuando incluyeron solo el 4% de taninos en la dieta de vacas lecheras. En esta investigación, la inclusión de 2.5 y 5% de taninos condensados disminuyó la digestibilidad con respecto al tratamiento testigo.

La disminución en la fermentación de la materia seca en el rumen es atribuida a la formación de complejo tanino-moléculas del alimento, lo cual impide el ataque microbiano, haciendo los sustratos indisponibles para la digestión (McSweeney *et al.*, 2001; Smith *et al.*,

2005). Por otra parte, los taninos condensados pueden inhibir directamente a los microbios que degradan los sustratos en el rumen, blindando su pared celular o disminuyendo la actividad de las enzimas extracelular (Scalbert, 1991; Bae *et al.*, 1993), un ejemplo, es el caso de *Fibrobacter succinogenes* que incrementa células asociadas a actividad endogluconasa como actividad extracelular que es inhibida por la presencia de taninos (Smith *et al.*, 2005). De manera general, Smith *et al.* (2005) reportan que la inclusión de 0.7- 2% de taninos condensados tienen efecto sobre la composición de las poblaciones bacterianas del rumen.

Cuadro 8. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) a 72 h pos incubación con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados.

Tratamiento	Horario de incubación							
	3	6	9	12	18	24	48	72
T1	29.22 ^a	35.75 ^{ab}	38.87 ^a	44.12 ^a	48.37 ^a	53.17 ^a	71.65 ^a	73.22 ^a
T2	28.85 ^{ab}	32.00 ^c	35.42 ^b	38.87 ^{cd}	43.17 ^c	46.02 ^c	63.65 ^c	65.47 ^b
T3	28.75 ^{ab}	31.42 ^{cd}	34.35 ^{bcd}	37.07 ^{efg}	40.87 ^d	43.85 ^d	61.72 ^d	64.85 ^b
T4	29.02 ^a	35.12 ^{ab}	38.35 ^a	41.57 ^b	47.45 ^a	52.40 ^{ab}	69.72 ^b	72.37 ^a
T5	28.72 ^{ab}	31.52 ^{cd}	35.07 ^{bc}	38.65 ^{cde}	42.97 ^c	45.62 ^c	61.55 ^{de}	62.90 ^c
T6	28.45 ^{abc}	30.52 ^d	33.82 ^{cd}	36.55 ^{fg}	40.22 ^d	42.75 ^d	60.10 ^{ef}	61.30 ^{cd}
T7	28.77 ^{ab}	34.27 ^b	37.47 ^a	40.37 ^{bc}	45.75 ^b	51.20 ^b	69.32 ^b	71.70 ^a
T8	28.00 ^{bc}	31.25 ^{cd}	33.92 ^{cd}	38.17 ^{def}	40.85 ^d	43.55 ^d	60.22 ^{ef}	62.40 ^{cd}
T9	27.72 ^c	30.47 ^d	33.00 ^d	36.05 ^g	39.95 ^d	42.52 ^d	59.20 ^f	61.02 ^d
Pa	0.0053	0.0109	0.0002	0.0009	0.0002	0.0001	<.0001	<.0001
Pt	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Pa*Pt	<.0001	0.0473	0.854	0.0020	0.001	0.0170	0.4378	.0271
EEM	0.537	0.564	0.6563	0.8901	0.7779	0.7827	0.8590	0.8963

AO= Aceite de oliva, TC= Taninos condensados y Al= alfalfa.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

^{a,b,c}. Valores con distinta literal en una columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

6.6 Materia residual de la fibra detergente neutro

Los resultados de la materia residual de la fibra detergente neutro (FDN), con incubaciones a diferentes horarios hasta 72 h, se muestran en el Cuadro 9. El análisis estadístico permitió detectar efecto ($P < 0.05$) en la materia residual de la FDN del factor aceite a las 9 y 12 h de incubación, para el factor taninos en todos los horarios de incubación, y en la interacción de factores aceite x taninos a las 12, 18 y 24 h. Con base a los resultados de la materia residual de la FDN al final del periodo de incubación (72 h), los tratamientos T3, T6, T8 y T9 mostraron los valores más altos ($P < 0.05$) de esta fracción, implicando menor ($P < 0.05$) digestibilidad de la FDN y se relacionó con aquellos tratamientos que incluyeron los niveles más altos de taninos. Por el contrario, los tratamientos T1, T4 y T7 mostraron los valores más bajos ($P < 0.05$), indicando la mayor digestibilidad de la FDN, y los tratamientos involucrados se caracterizaron por la ausencia de taninos.

Está documentado que concentraciones de 3% de taninos condensados disminuye la digestibilidad de fibra detergente neutro (Al-Dobaib, 2009). De forma similar, el uso de 5% de taninos condensados disminuyó la digestibilidad de la fibra detergente neutro de 65.8 a 59.9% en dietas para corderos (Dawson *et al.*, 1999), y de 61 a 49% en dietas para ovejas (Salawu *et al.*, 1997). Ahnert *et al.* (2015) en un estudio *in vivo* con vacas lecheras, reporta diferencias en la digestibilidad de la fibra detergente neutro, al incluir 4 y 6% de taninos, observándose una disminución de esta fracción de 12.95 y 17.82 % (4 y 6% de taninos, respectivamente) con respecto a la dieta testigo. Lo anterior fundamenta los resultados observados en este estudio cuando se utilizaron los niveles más altos de taninos, lo que inhibió el crecimiento de microorganismos celulíticos. Al respecto, Salawu *et al.* (1997) confirmó la posibilidad de reducir las bacterias celulíticas con la adición de taninos en la dieta. Se ha demostrado que los taninos de quebracho inhiben la digestión de la fibra, al

afectar el crecimiento y la actividad de los microorganismos ruminales en estudios *in vitro* (Makkar *et al.*, 1995), acorde con los resultados observados en la reducción de la digestibilidad de la FDN del presente estudio. Los microbios ruminales son inhibidos por los taninos condensados directamente al blindar la pared celular o al disminuir la actividad de enzimas extracelulares (Bae *et al.*, 1993; Scalbert, 1991; McSweeney *et al.*, 2001); ejemplo de lo anterior se esquematiza con el caso de *Fibrobacter succinogenes*, una bacteria que se desarrolla en estos medios e incrementa enzimas asociadas a actividad endogluconasa como actividad extracelular, y que es inhibida por la presencia de taninos (Smith *et al.*, 2005).

Cuadro 9. Materia residual de la fibra detergente neutro de alfalfa a 72 h pos incubación *in vitro* con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados.

Tratamiento	Horario de incubación							
	3	6	9	12	18	24	48	72
T1	41.75 ^a	38.95 ^a	36.77 ^b	34.72 ^c	31.65 ^c	28.55 ^d	21.50 ^b	20.25 ^c
T2	40.55 ^{ab}	38.80 ^a	37.90 ^a	36.65 ^{ab}	34.47 ^{ab}	32.47 ^{bc}	24.02 ^a	21.72 ^b
T3	39.90 ^b	38.62 ^a	37.70 ^{ab}	36.95 ^a	35.32 ^a	33.87 ^a	24.12 ^a	22.70 ^a
T4	41.50 ^a	39.62 ^a	37.30 ^{ab}	34.75 ^c	31.60 ^c	28.62 ^d	21.65 ^b	20.45 ^c
T5	40.70 ^{ab}	39.32 ^a	37.72 ^a	36.35 ^{ab}	34.05 ^b	31.95 ^c	23.92 ^a	22.35 ^{ab}
T6	39.80 ^b	38.45 ^a	37.65 ^{ab}	36.90 ^a	35.15 ^{ab}	33.12 ^{ab}	24.07 ^a	22.75 ^a
T7	40.80 ^{ab}	38.90 ^a	37.65 ^{ab}	35.90 ^b	32.75 ^c	29.15 ^d	21.80 ^b	20.50 ^c
T8	40.50 ^{ab}	39.52 ^a	37.87 ^a	36.70 ^{ab}	34.32 ^{ab}	31.97 ^c	23.87 ^a	22.45 ^{ab}
T9	39.77 ^b	38.70 ^a	38.10 ^a	37.05 ^a	34.80 ^{ab}	33.02 ^{ab}	24.22 ^a	22.87 ^a
Pa	0.2048	0.4014	0.0412	0.0078	0.2170	0.0906	0.8618	0.0450
Pt	<0.0001	0.0412	0.0013	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Pa*t	0.4430	0.3583	0.2180	0.0521	0.0165	0.0324	0.8799	0.4965
EEM	0.5342	0.6304	0.3973	0.4189	0.4915	0.4318	0.4309	0.3714

AO= Aceite de oliva, TC= Taninos condensados y Al= alfalfa.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

^{a,b,c,d,e} Valores con distinta literal en una columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

6.7 Materia residual de la fibra detergente ácido

Los resultados para la materia residual de la fibra detergente ácido (FDA) se muestran en el Cuadro 10. Se detectaron efectos ($P < 0.05$) en la materia residual de la FDN para el factor aceite y para el factor taninos en todos los horarios de incubación, y para la interacción de factores aceite x taninos a las 3, 9, 48 y 72 h. Con base a los resultados de la materia residual de la FDA al final del periodo de incubación (72 h), los tratamientos T3, T6 y T8 mostraron los valores más altos ($P < 0.05$) de esta fracción, implicando menor ($P < 0.05$) digestibilidad de la FDN y se relacionó con aquellos tratamientos que incluyeron los niveles más altos de taninos. En contraste, los tratamientos T1, T2 y T7, que contenían los niveles más bajos de taninos, mostraron los valores más bajos ($P < 0.05$) de materia residual de FDN, y se relacionó con una mayor digestibilidad de la FDN.

En un estudio *in vivo* realizado por Salawu *et al.* (1997) en ovejas, donde se incluyó 5% de taninos condensados en la dieta, se concluyó que la digestibilidad aparente de fibra detergente ácido disminuyó en 12 unidades porcentuales con el uso de taninos en comparación con el tratamientos testigo. De manera similar, Al-Dobaib (2009) reportaron un disminución de 21.81% en la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente ácido cuando se incluyeron taninos condensados al 3%, con respecto a la dieta testigo. Por otra parte, Ahnert *et al.* (2015) en un estudio con vacas lecheras, reporta una disminución en la digestibilidad, observando valores de 13.48 y 20.86% con niveles 4 y 6 % de taninos, respectivamente. Se ha demostrado que los taninos de quebracho inhiben la digestión de la fibra, al afectar a los microbios del rumen en estudios *in vitro* (Makkar *et al.*, 1995), similar a lo observado en este estudio.

Cuadro 10. Materia residual de la fibra detergente ácido de alfalfa a 72 h pos incubación *in vitro* con niveles crecientes de aceite de olivo y de taninos condensados.

Tratamiento	Horario de incubación							
	3	6	9	12	18	24	48	72
T1	27.18 ^a	26.32 ^a	25.35 ^a	24.41 ^a	23.38 ^a	21.68 ^a	16.94 ^b	14.81 ^d
T2	26.69 ^{ab}	25.65 ^{ab}	25.10 ^a	24.40 ^a	23.35 ^a	22.25 ^a	17.80 ^a	14.77 ^d
T3	25.05 ^{cd}	24.38 ^{de}	23.95 ^{bc}	23.62 ^b	23.01 ^a	22.29 ^a	18.64 ^a	16.73 ^a
T4	26.59 ^{ab}	25.54 ^b	24.38 ^b	22.99 ^{bc}	21.75 ^b	20.25 ^b	16.28 ^{bc}	15.70 ^{bc}
T5	26.01 ^b	24.79 ^{cd}	23.95 ^{bc}	22.63 ^{cd}	21.51 ^b	20.43 ^b	16.73 ^{bc}	16.01 ^b
T6	24.56 ^{cd}	23.68 ^{ef}	22.94 ^e	22.54 ^{cd}	21.45 ^b	20.80 ^b	16.42 ^{bc}	15.54 ^a
T7	26.40 ^b	25.46 ^{bc}	23.58 ^{cd}	22.76 ^{cd}	21.55 ^b	20.21 ^b	16.04 ^c	15.14 ^{cd}
T8	25.21 ^c	24.10 ^{def}	23.25 ^{de}	22.56 ^{cd}	21.32 ^b	20.37 ^b	16.35 ^{bc}	16.10 ^{ab}
T9	24.42 ^d	23.50 ^f	22.87 ^e	22.21 ^d	21.28 ^b	20.79 ^b	16.54 ^{bc}	15.77 ^{bc}
Pa	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0078
Pt	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0032	0.0018	0.0001	0.0001
Pa*t	0.049	0.15	0.0026	0.27	0.55	0.71	0.0018	0.0001

AO= Aceite de oliva, TC= Taninos condensados y Al= alfalfa.

T1= 0% AO, 0% de TC y 100% Al; T2= 0% AO, 2.5% TC y 97.5%; T3= 0% AO, 5% TC y 95%; T4= 2.5% AO, 0% TC y 97.5% Al; T5= 2.5% AO, 2.5% TC y 95.0% Al; T6= 2.5% AO, 5% TC y 92.5% Al; T7= 5% AO, 0% TC y 95% Al; T8= 5% AO, 2.5% TC y 92.5% Al; T9= 5% AO, 5% TC y 90% Al.

^{a,b,c,d,e,f} Valores con distinta literal en una columna indican diferencias estadísticas (P<0.05).

7. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la biohidrogenación del ácido oleico en un medio ruminal *in vitro* no es afectada por la presencia de niveles de 2.5 y 5% de taninos condensados; sin embargo, esta concentración de taninos si afecta parcialmente la biohidrogenación del ácido linoleico y de forma significativa la de linolénico.

Los niveles de taninos condesados y aceite de oliva evaluados no afectaron el pH, pero la adición de 5% de taninos condensados disminuyó la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de metano.

Así mismo, niveles mayores a 2.5% de taninos condensados disminuyeron la digestibilidad de la materia seca y la desaparición de la FDN y FDA en condiciones *in vitro*.

8. LITERATURA CITADA

- AbuGhazaleh, A. A., Riley M. B., Thies E. E. and Jenkins C. T., 2005. Dilution Rate and pH Effects on the Conversion of Oleic Acid to *Trans* C_{18:1} Positional Isomers in Continuous Culture. *J. Dairy Sci.* 88: 4334-4341.
- Aerts, R. J., Barry T. N. and McNabb W. C., 1999. Review Paper Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75: 1–12.
- Ahnert, S., Dickhoefer U., Schulz F. and Susenbeth., 2015. Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. *Livestock Science* 177: 63–70.
- Al-Dobaib, S.N., 2009. Effect of different levels of Quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. *J. Anim. Sci.* 80: 532-541.
- ANKOM, 2014a. Acid Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I). <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-a2000>. (Consultado el 10 de septiembre de 2014).
- ANKOM, 2014b. *In vitro* true digestibility using the DAISY Incubator. <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/daisy-incubators>. (Consultado el 10 de septiembre de 2014).

- ANKOM, 2014c. Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I). <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-a2000>. (Consultado el 10 de septiembre de 2014).
- AOAC., 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD. USA. Vol. 1.500 p.
- Bae, H.D., McAllister, T.A., Yanke, J., Cheng, K.J., Muir, A.D., 1993. Effect of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2132–2138.
- Bauman, D.E., Baumgard L.H., Corl B.A. y Griinari J.M., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acids in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. <http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/CLA.pdf>. (Consultado 17 Septiembre 2014)
- Beauchemin, K.A., McGinn S. M., Martinez T. F. and McAllister T. A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim Sci.* 85:1990-1996
- Benchaar, C., McAllister T. A., and Chouinard P. Y., 2008. Digestion, Ruminal Fermentation, Ciliate Protozoal Populations, and Milk Production from Dairy Cows Fed Cinnamaldehyde, Quebracho Condensed Tannin, or *Yucca schidigera* Saponin Extracts. *J. Dairy Sci.* 91:4765–4777.
- Bhatta, R., Uyeno Y., Tajima K., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O. y Kurihara M., 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane

and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 92: 5512-5522.

Buccioni, A., Antongiovanni M., Petacchi F., Mele M., Serra A., Secchiari P. y Benvenuti D., 2006. Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: An *in vitro* rumen fermentation study. *Animal Feed Science and Technology.* 127: 268–282.

Buccioni, A., Decandia M., Minieri S., Molle G., Cabidu A., 2012. Review Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology* 174:1-25.

Carreño, D., Hervás G., Toral P. G., Belenguer A. and Frutos P., 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate *in vitro* ruminal biohydrogenation in sheep. *Animal Feed Science and Technology.* 202: 42-51.

Carriquiry, M., Weber W. J., Baumgard L. H., and Crooker B.A., 2008. *In vitro* biohydrogenation of four dietary fats. *Animal Feed Science and Technology.* 141: 339-355.

Carulla, J. E., Kreuzer M., Machmiller A., y Hess H. D., 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 56:961–970.

Castillo, V. J., Olivera A. M. y Carulla F. J., 2013. Descripción del mecanismo bioquímico de la biohidrogenación en el rumen de ácidos grasos poliinsaturados: una revisión. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* 16(2): 459-468

- Cesaro, G., Tagliapietra F., Griolletto L., Cecchinato A., Dannenberg D., Giovanni B. y Schiavon S., 2013. Fecal simple preparation methods for gas chromatography analysis of fatty acids of ruminants fed different amounts of rumen protected conjugated linoleic acids (CLA). *Animal Feed Science and Technology*. 183: 184-194.
- Dawson, J. M., Buttery P. J., Jenkis D., Wood C. D and Gill M., 1999. Effects of dietary quebracho tannin on nutrient utilisation and tissue metabolism in sheep and rats. *J Sci Food Agric* 79:1423-1430.
- Dschaak, C. M., Williams C. M., Holt M. S., Eun J. S., Young A. J. and Min B. R., 2010. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 2508–2519
- Duckett, S. K. and Gillis M. H., 2010. Effects of oil source and fish oil addition on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J Animal Sci.* 88:2684-2691.
- Duckett, S. K., Andrae J. G., Owens F. N., 2002. Effect of high oil corn or added corn oil on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.* 80: 3353 – 3360.
- FEDNA, 2010. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal Tablas 2010. <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>. Consultado 20 de agosto del 2015.

- Fedorak, P. M., and S. E. Hrudey., 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4: 425- 432.
- Getachew, G., Pittroff W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S, DePeters E.J., 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology.* 140: 444–461
- Hayakawa, K., Linko Y. Y., Linko P., 2000. The role of *trans* fatty acids in human nutrition.
- Jayanegara, A., Leiber F., and Kreuzer M., 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro*. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition.* 96: 365–375
- Jenkins, T. C., 1993. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism; Lipid Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Science* 76: 3851-3863.
- Jenkins, T. C., 2010. Technical Note: Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. *J. Dairy Science.* 93: 1170-1174.
- Khiaosa, A. R., Bryner S. F., Scheeder M. R. L., Wettstein H. R., Leiber F., Kreuzer M. and Soliva C. R., 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α -linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J Dairy Sci.* 92:177-188.
- Kim, F. J., Huws, A. S., Lee M. R. L. and Scollan N. D., 2009. Dietary Transformation of Lipid in the Rumen Microbial Ecosystem. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 22, No. 9: 1341. 1350.

- Li, Y., Watkins B. A., 2001. Current protocols in food analytical chemistry. Analysis of fatty acids in food lipids, Unit D1.2.
- Liu, H., Vaddella V. y Zhou D., 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. J. Dairy Sci. 94: 6069-6077
- Makkar, H. P. S., 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluber Academic Publishers. Dordrech, the Netherlands. 102 p.
- Makkar, H. P. S., Becker K., Abel H. J., and Szegletti C., 1995. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on Fermentative processes in the RUSITEC. J. Sci. Food Agric. 69: 495-500.
- Martin, S.A., Jenkins, T.C., 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans* C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. J. Anim. Sci. 80, 3347-33.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-302.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Sci. Technol. 91: 83-93.
- Menke, K. H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. J. Agric. Sci. 93: 217-222.

- Mosley, E. E., Powell L. G., Riley B. M., y Jenkins C. T., 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers *in vitro*. J. Lipid Res. 43:290-296.
- Nocek, J. E., 1992. Feeding sequence and strategy effects on ruminal environment and production performance in first lactation cows. J. Dairy Sci. 75:3100–3108.
- Palmquist, D.L., and Jenkins T.C., 2003. Challenges With fats and fatty acid methods. J. Animal Science. 81: 3250-3254.
- Salawu, M. B., Acamovic T., Stewart C.S., F.D., Hovell F. D DeB., 1997. Quebracho tannins with or without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effect on digestibility of nutrients *in vivo* and degradation of grass hay in sacco and *in vitro*. Anim. FeedSci.Technol.69: 67–78.
- SAS., 2004. SAS/STAT User’s guide. (Release 9.1) SAS Publishing, Cary (NC). 1-7: 5180.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30: 3875-3883.
- Smith, A. H., Zoetendal E. y Mackie R. J., 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. Microb. Ecol. 50: 197-205.
- Toral, G. P., Hervás G., Belenguer A., Bichi E. and Frutos P., 2013. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. J Dairy. Sci. 96:431-439.
- Toral, G. P., Hervás G., Bichi E., Belenguer A., Frutos P., 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty

- acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*. 164: 199 – 206.
- Waghorn, G., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 147:116–139
- Wang, Y., Jacome S. M. M, and Proctor D. S., 2012. The role of ruminant *trans* fat as a potential nutraceutical in the prevention of cardiovascular disease. *Food Research International* 46: 460-468
- Wu, Z. and Palmquist D. L., 1991. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Sci*. 74: 3035-3046.
- Xie, D-Y., y Dixon A. R., 2005. Review: Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. *Phytochemistry*. 66: 2127-2144