



Thèse / Thesis

requis pour
l'obtention du Titre

submitted
for the Degree of

Master of Science

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA
CON TANINOS Y ACEITE DE PESCADO SOBRE LA
BIOHIDROGENACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y
LA FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO**

Saida JELLALI

Zaragoza, octubre 2015

**Institut Agronomique Méditerranéen de
Mediterranean Agronomic Institut of
Zaragoza**

**Université de Zaragoza
*University of Zaragoza***

**Fondation Espagnole pour le Développement
de la Nutrition Animale
*Spanish Foundation for the Development of Animal Nutrition***

Efecto de la suplementación de la dieta con taninos y aceite de pescado sobre la biohidrogenación de los ácidos grasos y la fermentación ruminal in vitro

Memoria de la Tesis de Máster presentada por
Saida Jellali

dirigida por
Dra. Pilar de Frutos Fernández
y Dr. Pablo Gutiérrez Toral

para la obtención del título de
Master of Science del CIHEAM en Nutrición Animal,
otorgado por el IAMZ-CIHEAM.

Zaragoza, septiembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Al terminar el trabajo, deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han puesto a nuestra disposición sus conocimientos y los medios necesarios para la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Pilar de Frutos y el Dr. Pablo Toral por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación. Quiero agradecer a Pilar su continuo apoyo, sus acertadas orientaciones, sus correcciones, su paciencia, y todo lo que he aprendido de ella, no solo a nivel profesional sino personal.

De igual manera, muchas gracias Dr. Gonzalo Hervás por toda su ayuda para realizar este trabajo y Dr. Álvaro Belenguer por contribuir con mucho ánimo a la realización del mismo.

Deseo manifestar también, mi gratitud al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), por el apoyo económico, académico y técnico.

Un especial agradecimiento al Dr. Armando Occon Plazahola, Coordinador Área de Producción Animal del IAMZ, por su atenta y seguimiento de la marcha de este trabajo.

Un agradecimiento a mis compañeros Alex, Hajer, Edgar, Carolina, Tamara y David que me animaron en todos los momentos.

Para terminar, los agradecimientos más importantes a mi familia en especial a mis padres Mohammed Habib y Zohra, por haberme apoyado a lo largo de todo este camino, por su preocupación, su cariño y por los valores que me han inculcado.

A mis hermanos, por ser parte importante de mi vida y representan la unidad familiar.

A Anouer por haber sido un excelente amigo, por haberme apoyado en las buenas y las malas y sobre todo por hacer de su familia, una familia para mí.

Esta tesis no hubiera sido posible sin vuestra apoyo.....MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

	Página
AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN	XXI
SUMMARY	XXV
RÉSUMÉ	XXIX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Metabolismo ruminal de los ácidos grasos	7
1.1. Lipólisis	7
1.2. Biohidrogenación	7
1.3. Hidratación	9
2. Efecto de la alimentación sobre el metabolismo ruminal de los ácidos grasos	11
2.1. Suplementación con lípidos de origen marino	11
2.2. Suplementación con extractos de taninos	14
III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Animales experimentales	25
2. Tratamientos experimentales	26
3. Cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y técnica de producción de gas	26
3.1. Parámetros indicativos de la fermentación ruminal	28
3.2. Biohidrogenación ruminal	29
4. Análisis químicos	29
4.1. Alimentos	29
4.2. Amoniaco, lactato y ácidos grasos volátiles	30
4.3. Ácidos grasos de cadena larga	31
5. Análisis estadísticos	32

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
1. Composición de la TMR y los aceites.....	35
2. Biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos	35
3. Fermentación ruminal in vitro.....	42
VI. CONCLUSIONES	47
VII. BIBLIOGRAFÍA	51

	Página
Tabla 1. Ingredientes (g/kg de materia fresca) de la TMR utilizada en las incubaciones in vitro	25
Tabla 2. Composición química del medio de cultivo	27
Tabla 3. Composición química (g/kg MS, excepto para la propia MS que es g/kg de materia fresca) de la TMR utilizada en las incubaciones in vitro	35
Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (g/100 AG totales) de la TMR y los aceites de girasol y de pescado utilizados en las incubaciones.....	36
Tabla 5. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos con 18 átomos de carbono en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.....	37
Tabla 6. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos (AG) ramificados, impares y poliinsaturados n-3 de cadena muy larga en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.....	41
Tabla 7. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco y lactato, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos	43

	Página
Figura 1. Rutas de biohidrogenación ruminal del ácido oleico (<i>cis</i> -9 18:1) y del ácido linoleico (<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2). Extraído de Jenkins et al. (2008).....	8
Figura 2. Principales rutas del metabolismo ruminal del <i>cis</i> -9 18:1 y <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2 (adaptado de Castro-Carrera, 2014)	10
Figura 3. Estructura molecular de (a) un tanino hidrolizable y (b) un tanino condensado (Khanbabaei y van Ree, 2001).....	15
Figura 4. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.....	38

AG	Ácidos grasos
AGV	Ácidos grasos volátiles
A/P	Relación acético/propiónico
BH	Biohidrogenación
CLA	Ácido linoleico conjugado
DHA.....	Ácido docosahexaenoico (22:6n-3)
DMOX.....	Derivados 4,4-dimetiloxazolínicos
DMS	Desaparición de MS
DPA	Ácido docosapentaenoico (22:5n-3)
EE	Extracto etéreo
eed	Error estándar de la diferencia
EPA.....	Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)
FAD.....	Fibra ácido detergente
FAME.....	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID.....	Detector de ionización de llama
FND	Fibra neutro detergente
GC	Cromatógrafo de gases
GC-MS.....	Cromatografía de gases y espectrometría de masas
ivDV.....	Digestibilidad verdadera in vitro
MO	Materia orgánica
MS.....	Materia seca
N.....	Nitrógeno
n.d.	No detectado
ns	No significativo
P	Probabilidad (nivel de significación)
PB.....	Proteína bruta
PV.....	Peso vivo
TC.....	Taninos condensados
TH.....	Taninos hidrolizables
TMR.....	Ración completa mezclada (<i>total mixed ration</i>)
VA.....	Ácido vaccénico (<i>trans-11 18:1</i>)

La suplementación de la dieta de los rumiantes con lípidos de origen marino permite aumentar el contenido en la leche y la carne de algunos compuestos potencialmente beneficiosos para la salud, como los ácidos grasos (AG) poliinsaturados n-3. Además, gracias a su capacidad para modular la biohidrogenación (BH) ruminal, estos suplementos pueden mejorar la concentración del isómero *cis-9 trans-11* del ácido linoleico conjugado (CLA) en los productos finales. De acuerdo con la literatura, también los taninos pueden modificar de forma positiva la BH, pero se desconoce si el uso combinado de ambos tipos de compuestos podría dar lugar a efectos aditivos, sinérgicos o incluso antagónicos.

Este trabajo de tesis de máster se planteó, por lo tanto, para investigar los efectos de la suplementación de la dieta con aceite de pescado y taninos sobre la BH de los AG, así como sus consecuencias sobre la fermentación en el rumen (con vistas a su posible aplicación práctica). Para ello, se llevó a cabo un ensayo in vitro mediante cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y la técnica de producción de gas, en el que se evaluaron los siguientes tratamientos: Control, Pescado (que incluía un 1% de aceite de pescado), Roble (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de roble), Uva (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de uva), Pescado+Roble y Pescado+Uva (combinaciones de los tratamientos previos). Como donantes del inóculo ruminal para las incubaciones se utilizaron ovejas canuladas en el rumen.

De acuerdo con los análisis del perfil lipídico, las dietas suplementadas con aceite de pescado aumentaron notablemente las concentraciones de 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3 e inhibieron el último paso de la BH, reduciendo la formación de 18:0 e incrementando la de algunos isómeros *trans* 18:1, pero no la del *trans-11* 18:1. La mayor concentración de *trans-11 trans-15* 18:2 sugiere que el aceite de pescado también podría inhibir etapas previas de la BH, si bien esto no afectó a la acumulación de los isómeros del CLA.

Por el contrario, en las condiciones estudiadas, la administración de taninos de roble o uva no tuvo efectos significativos sobre la BH ruminal y su uso combinado con el aceite de pescado tampoco causó variaciones en el perfil de AG más allá de las observadas con el suplemento lipídico. Las únicas excepciones se observaron con el

tratamiento Pescado+Uva y consistieron en una mayor acumulación de *cis*-11 18:1, atribuible a una inhibición de su saturación a 18:0, y un pequeño aumento en la concentración de 17:0. En cambio, las proporciones de otros AG impares y ramificados, los cuales se han empleado como biomarcadores microbianos, permanecieron inalteradas, lo que parece sugerir que las poblaciones bacterianas del rumen se vieron poco afectadas por los tratamientos experimentales.

En cuanto a los parámetros indicativos de la fermentación ruminal, no se detectaron diferencias significativas en el pH, las concentraciones de amoníaco, ácido láctico o AG volátiles, la producción de gas o la desaparición de materia seca a las 24 h. Tan solo la digestibilidad verdadera *in vitro* y la proporción molar de isoácidos mostraron una tendencia a ser menores con algunos tratamientos (i. e., con el roble en el primer caso y con las combinaciones de aceite de pescado más taninos en ambos). Por lo tanto, la fermentación ruminal no se habría visto perjudicada de forma notable por los suplementos estudiados.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo no permiten recomendar la utilización conjunta de aceite de pescado y extractos de taninos como una estrategia nutricional efectiva para modular la BH ruminal y favorecer la acumulación de AG con efectos potencialmente saludables para los consumidores.

SUMMARY

Supplementation of ruminant diets with marine lipids enables to increase the milk and meat content of some potentially health promoting metabolites, such as n-3 polyunsaturated fatty acids (FA). Furthermore, due to their ability to modulate the ruminal biohydrogenation (BH), these supplements may improve the concentration of the *cis-9 trans-11* conjugated linoleic acid (CLA) isomer in ruminant-derived products. According to the literature, tannins also seem to be able to favourably modify the BH process, although it is unknown whether the combined use of both types of compounds might result in additive, synergistic or even antagonistic effects.

This master thesis was therefore proposed to investigate the impact of diet supplementation with fish oil and tannins on the ruminal BH, as well as on the fermentation (with a view on their possible practical application). To this end, an *in vitro* assay using batch cultures of rumen microorganisms and the gas production technique was carried out and the following treatments were evaluated: Control, Fish (containing 1% fish oil), Oak (containing 2% of a commercial extract of oak tannins), Grape (containing 2% of a commercial extract of grape tannins), Fish+Oak and Fish+Grape (combinations of previous treatments). Cannulated sheep were used as donors of rumen inocula for the incubations.

The lipid profile analysis revealed that fish oil-supplemented diets increased considerably the concentrations of 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 and inhibited the last step of ruminal BH, reducing the formation of 18:0 and enhancing some *trans* 18:1 isomers, but not *trans-11* 18:1. A greater concentration of *trans-11 trans-15* 18:2 suggests that fish oil could also inhibit previous stages of BH, although this did not affect the accumulation of CLA isomers.

Conversely, in the studied conditions, the administration of oak or grape tannins did not exert significant effects on ruminal BH, and their combination with fish oil did not cause variations in the FA profile other than those observed with the lipid supplement. The only exceptions were observed with the treatment Fish+Grape and comprised a higher accumulation of *cis-11* 18:1, which might be due to an inhibition of its saturation to 18:0, and a small increase in the concentration of 17:0. In contrast, the proportions of other odd- and branched-chain FA, which have been used as microbial

biomarkers, remained unaltered, probably suggesting that rumen bacterial populations were hardly affected by the experimental treatments.

Regarding the rumen fermentation parameters, no significant differences were detected in the pH, ammonia, lactic acid or volatile FA concentrations, the gas production or the dry matter disappearance at 24h. Only the *in vitro* true digestibility and the molar proportion of isoacids showed a trend to be lower with some treatments (i.e., with oak in the former case and with the combination of fish oil and tannins in both). Hence, ruminal fermentation would not have been substantially impaired by the studied supplements.

Overall, the results obtained in this work do not allow to recommend the combined use of fish oil and tannin extracts as an effective nutritional strategy to modulate ruminal BH and favour the accumulation of FA with potential benefits to consumer's health.

La supplémentation du régime des ruminants avec des lipides d'origine marine permet d'augmenter le contenu dans le lait et la viande de certains composés potentiellement bénéfiques pour la santé, comme les acides gras (AG) polyinsaturés n-3. Par ailleurs, grâce à son potentiel pour moduler la biohydrogénation (BH) ruminale, ce type de suppléments peut améliorer la concentration de l'isomère *cis-9 trans-11* de l'acide linoléique conjugué (CLA) dans les produits finals. Selon la littérature, les tannins peuvent aussi modifier de manière positive la BH, mais il n'est pas connu si l'utilisation combinée des deux types de composés peut donner des effets additifs, synergiques ou même antagoniques.

Par conséquent, ce travail de thèse a été conduit dans l'objectif d'examiner les effets de la supplémentation du régime avec de l'huile de poisson et des tannins sur la BH des AG, ainsi que les conséquences sur la fermentation ruminale (envisageant son application pratique). Un essai *in vitro* a été donc mené moyennant des cultures discontinues de microorganismes ruminiaux et la technique de production de gaz, pour évaluer les traitements suivants: Témoin, Poisson (avec 1% d'huile de poisson), Chêne (avec 2% d'un extrait commercial de tannins de chêne), Raisin (avec 2% d'un extrait commercial de tannins de raisin), Poisson+Chêne et Poisson+Raisin (combinaisons des traitements précédents). Des brebis canulées au rumen ont été utilisées en tant que donatrices de l'inoculum ruminal pour les incubations.

Selon les analyses du profil lipidique, les régimes supplémentés en huile de poisson augmentèrent remarquablement les concentrations de 20:5n-3, 22:5n-3 et 22:6n-3 et inhibèrent le dernier pas de la BH ruminale, diminuant la formation de 18:0 et incrémentant celle de quelques isomères 18:1, mais pas celle du *trans-11* 18:1. La plus forte concentration de *trans-11 trans-15* 18:2 suggère que l'huile de poisson peut aussi inhiber des étapes précédentes de la BH, bien que ceci n'affecta pas l'accumulation des isomère du CLA.

Par contre, dans les conditions étudiées, l'administration de tannins de chêne et de raisin n'a pas eu des effets significatifs sur la BH ruminale et leur utilisation combinée avec de l'huile de poisson n'entraîna pas des variations du profil en AG au-delà de celles observées avec le supplément lipidique. Les seules exceptions qui ont été observées avec le traitement Poisson+Raisin, montrent de plus fortes

accumulations de *cis*-11 18:1, attribuables à l'inhibition de sa saturation en 18:0 et à une faible augmentation du 17:0. En revanche, les proportions des autres AG impairs et ramifiés, lesquels ont été employés comme biomarqueurs microbiens, restèrent inaltérées, ce qui suggère que les populations bactériennes du rumen étaient peu affectées par les traitements expérimentaux.

En ce qui concerne les paramètres indicatifs de la fermentation ruminale, les résultats n'ont pas révélé de différences significatives au niveau du pH, des concentrations d'ammoniac, d'acide lactique ou des AG volatils, de la production de gaz ou de la disparition de matière sèche à 24 h. Seulement la digestibilité vraie mesurée *in vitro* et la proportion molaire d'isoacides montrèrent une tendance à diminuer avec quelques traitements (c.à.d., avec du Chêne dans le premier cas et avec des combinaisons d'huile de poisson et des tannins dans les deux cas). En conséquence, les suppléments étudiés n'ont pas eu d'effets négatifs notables sur la fermentation ruminale.

En conclusion, les résultats de cette thèse ne permettent pas de recommander l'utilisation conjointe d'huile de poisson et d'extraits de tannins comme stratégie nutritionnelle effective pour moduler la BH ruminale et favoriser l'accumulation des AG avec des effets potentiellement positifs pour les consommateurs.

I. INTRODUCCIÓN

Existe numerosa evidencia científica acerca de las características potencialmente beneficiosas de los ácidos grasos (AG) omega-3 de cadena muy larga sobre la salud humana. Entre estos AG destacan el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), el docosapentaenoico (DPA; 22:5n-3) o el eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3), los cuales parecen esenciales para el desarrollo neuronal del feto y del recién nacido, así como para mantener adecuadamente las funciones neurológicas y cognitivas en los adultos (Simopoulos, 2009). Por ello, hay un elevado interés por aumentar su contenido en la dieta de los humanos (Lock y Bauman, 2004).

Estos ácidos grasos se encuentran fundamentalmente en alimentos de origen marino (especialmente en el pescado azul) y su contenido en la leche o la carne de rumiantes es bastante bajo, aunque puede incrementarse mediante la suplementación de las raciones de estos animales con lípidos marinos (e. g., con aceite de pescado o microalgas marinas). Dado el interés final de esta posibilidad (es decir, el interés de aumentar la concentración de AG n-3 de cadena muy larga en determinados alimentos y conseguir así un mayor consumo con la dieta), en las dos últimas décadas se han realizado numerosos trabajos de investigación al respecto. Gracias a ello, existe ya una amplia evidencia de este incremento no solo en el ganado vacuno sino también en el caprino y en el ovino (Toral et al., 2010a; Doreau et al., 2011; Bichi et al., 2013).

No obstante, es importante señalar que el principal interés de suplementar la dieta de los animales rumiantes con lípidos de origen marino no radicaría en aumentar el contenido de estos AG n-3 de cadena muy larga en los productos finales (carne o leche) sino en su potencial para inhibir el último paso de la biohidrogenación (BH) ruminal de los AG insaturados (Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2012).

Este último paso es el responsable de convertir el *trans*-11 18:1 (ácido vaccénico, VA) en ácido esteárico (18:0). Por su parte, el VA es el principal precursor de la síntesis endógena de *cis*-9 *trans*-11 18:2 en los tejidos animales (incluidos los humanos). A su vez, este es el isómero más abundante del ácido linoleico conjugado (CLA) y el responsable de los efectos potencialmente beneficiosos para la salud de los humanos que se le atribuyen al CLA (por ejemplo, antiaterogénicos, anticancerígenos, antidiabetogénicos, inmunomoduladores, etc.; Lock y Bauman, 2004).

Por lo tanto, tratar de inhibir el último paso de la BH para conseguir una mayor acumulación de VA en el rumen y, posteriormente, de CLA en la leche o la carne, es un objetivo de interés incuestionable en el campo de la nutrición animal para mejorar la calidad nutricional de los productos derivados de los rumiantes.

De acuerdo con la información publicada, además de los AG n-3 de cadena muy larga, también los taninos parecen ser capaces de inhibir el último paso de la BH (Khiaosa-ard et al., 2009; Vasta et al., 2009a). No obstante, existe una importante controversia, probablemente asociada al tipo de tanino utilizado, acerca del efecto de estos compuestos fenólicos, ya que su acción podría dirigirse al proceso completo de BH y no solo al último paso (Benhissi et al., 2013b; Minieri et al., 2014; Carreño et al., 2015).

Por lo tanto, aunque los objetivos específicos de este trabajo se definen en un capítulo posterior, cabría señalar aquí, para cerrar este apartado, que este estudio se llevó a cabo para evaluar la capacidad de dos tipos de compuestos completamente diferentes (los AG n-3 de cadena muy larga y los taninos) para modular la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta y conseguir así un mayor flujo duodenal (y finalmente un mayor contenido en la carne y la leche) de AG “deseables” por sus efectos potencialmente saludables para los consumidores.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. METABOLISMO RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El metabolismo de los lípidos de la dieta es un proceso de máxima importancia para el mantenimiento del ecosistema del rumen, ya que, si bien no representa una actividad esencial para nutrir a los microorganismos que lo colonizan, permite reducir el efecto tóxico de algunos AG insaturados sobre su crecimiento (Harfoot y Hazlewood, 1997; Lourenço et al., 2010). Este proceso es responsable de las grandes diferencias entre el perfil de los AG que entran en el rumen y los que alcanzan el duodeno. Así, los lípidos de la dieta son principalmente insaturados (ricos en 18:2n-6 y 18:3n-3), en tanto que los AG que se absorben en el intestino son en su mayor parte saturados (e. g., 18:0; Jenkins et al., 2008; Shingfield y Wallace, 2014). Por lo tanto, la composición de los AG disponibles para la captación en los tejidos de los rumiantes (especialmente músculo o glándula mamaria) depende en gran medida de las transformaciones ocurridas en el rumen, lo que repercute de forma notable sobre la calidad nutricional de sus productos como la leche o la carne (Lock y Bauman, 2004; Doreau et al., 2011).

1.1. Lipólisis

Los lípidos de los alimentos se encuentran principalmente esterificados, bien en forma de fosfo- y glucolípidos en el caso de los forrajes, o bien de triglicéridos en el de los suplementos lipídicos (e. g., las semillas oleaginosas y los aceites; Harfoot y Hazlewood, 1997; Jenkins et al., 2008). El proceso de lipólisis consiste en la acción de lipasas presentes en el rumen sobre los enlaces éster que unen los AG y los alcoholes, que al ser hidrolizados liberan los AG libres al medio (Lourenço et al., 2010). Este proceso se lleva a cabo fundamentalmente por las lipasas microbianas, aunque también existe cierta actividad lipolítica en el propio material vegetal (Shingfield y Wallace, 2014). Dentro de comunidad microbiana ruminal, las bacterias se consideran las principales responsables de la lipólisis (Harfoot y Hazlewood, 1997; Jenkins et al., 2008).

1.2. Biohidrogenación

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de BH constituye un mecanismo de detoxificación que ha sido desarrollado por algunos microorganismos en respuesta al efecto inhibitorio que los AG insaturados ejercen sobre su crecimiento

(Maia et al., 2007; Jenkins et al., 2008). Este proceso consiste en una serie de reacciones enzimáticas secuenciales, las cuales incluyen pasos de isomerización e hidrogenación, y lleva a la saturación de los AG (Harfoot y Hazlewood, 1997). Actualmente, se sabe que las bacterias son las principales responsables de la BH ruminal y los protozoos la llevarían a cabo gracias a la actividad de la bacterias ingeridas, mientras que la contribución de los hongos parece ser insignificante (Jenkins et al., 2008; Lourenço et al., 2010). Sin embargo, aunque se han realizado numerosos estudios para elucidar qué bacterias podrían estar implicadas en la BH, aún existen muchas incertidumbres al respecto. Ello se atribuye, al menos en parte, a que se ha prestado gran atención al estudio de las cepas involucradas en la BH ruminal in vitro (e. g., las del género *Butyrivibrio*), pero estas bacterias no parecen tener un papel dominante en el proceso in vivo y las realmente implicadas podrían no haber sido aún aisladas o no ser cultivables (Huws et al., 2010; Castro-Carrera et al., 2014).

En los últimos años, se ha pasado de asumir que la BH era un proceso relativamente sencillo, con un número muy limitado de reacciones enzimáticas (Figura 1), a saber que existe un elevado número de rutas metabólicas alternativas (Figura 2; Harfoot y Hazlewood, 1997; Shingfield y Wallace, 2014), lo que conlleva la formación de una gran variedad de metabolitos intermedios que pueden pasar a la leche o la carne y tener efectos biológicos relevantes (Lock y Bauman, 2004; Doreau et al., 2011).

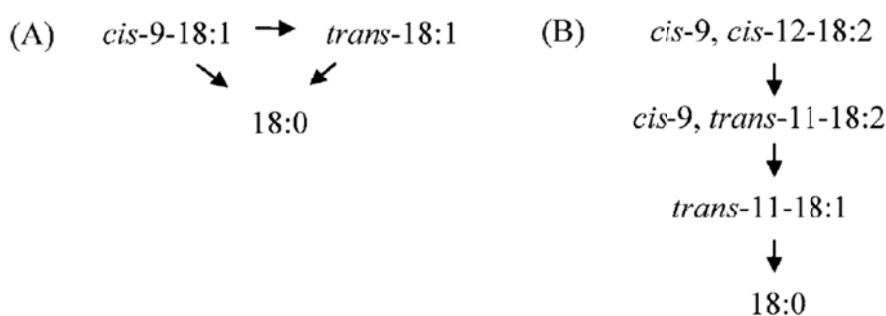


Figura 1. Rutas de biohidrogenación ruminal del ácido oleico (*cis-9 18:1*) y del ácido linoleico (*cis-9 cis-12 18:2*). Extraído de Jenkins et al. (2008).

Además de las rutas de BH principales, en la Figura 2 se muestran algunas de estas vías metabólicas alternativas en el proceso de BH de los ácidos oleico y linoleico. Entre ellas, destaca la que lleva a la formación de *trans*-10 *cis*-12 CLA y *trans*-10 18:1, que son de gran interés por su posible impacto sobre el rendimiento productivo y la calidad nutricional de la leche en rumiantes, al ser dos AG que se han asociado con frecuencia con el desarrollo del síndrome de baja grasa en la leche. Además, aún no está claro si el *trans*-10 18:1 podría tener efectos potencialmente nocivos para la salud del consumidor (Shingfield y Griinari, 2007; Doreau et al., 2011).

1.3. Hidratación

La hidratación de los AG en el rumen es un proceso metabólico del que aún se conoce poco y que podría ocurrir como alternativa a la BH para reducir el efecto tóxico de los AG insaturados sobre el crecimiento microbiano (ver la revisión de Castro-Carrera, 2014). Al igual que en el caso de la BH, todavía existe un elevado desconocimiento de las bacterias potencialmente implicadas en este proceso, cuya acción da lugar a cetoácidos como productos finales (e. g., 10-oxo-18:0; Figura 2; Jenkins et al., 2008). Aunque la formación de este tipo de metabolitos podría ser deseable para el consumidor por la posible actividad antitumoral y antiinflamatoria de algunos de ellos, también se han asociado con alteraciones del medio ruminal y con el síndrome de baja grasa en la leche en rumiantes alimentados con lípidos marinos (Castro-Carrera, 2014).

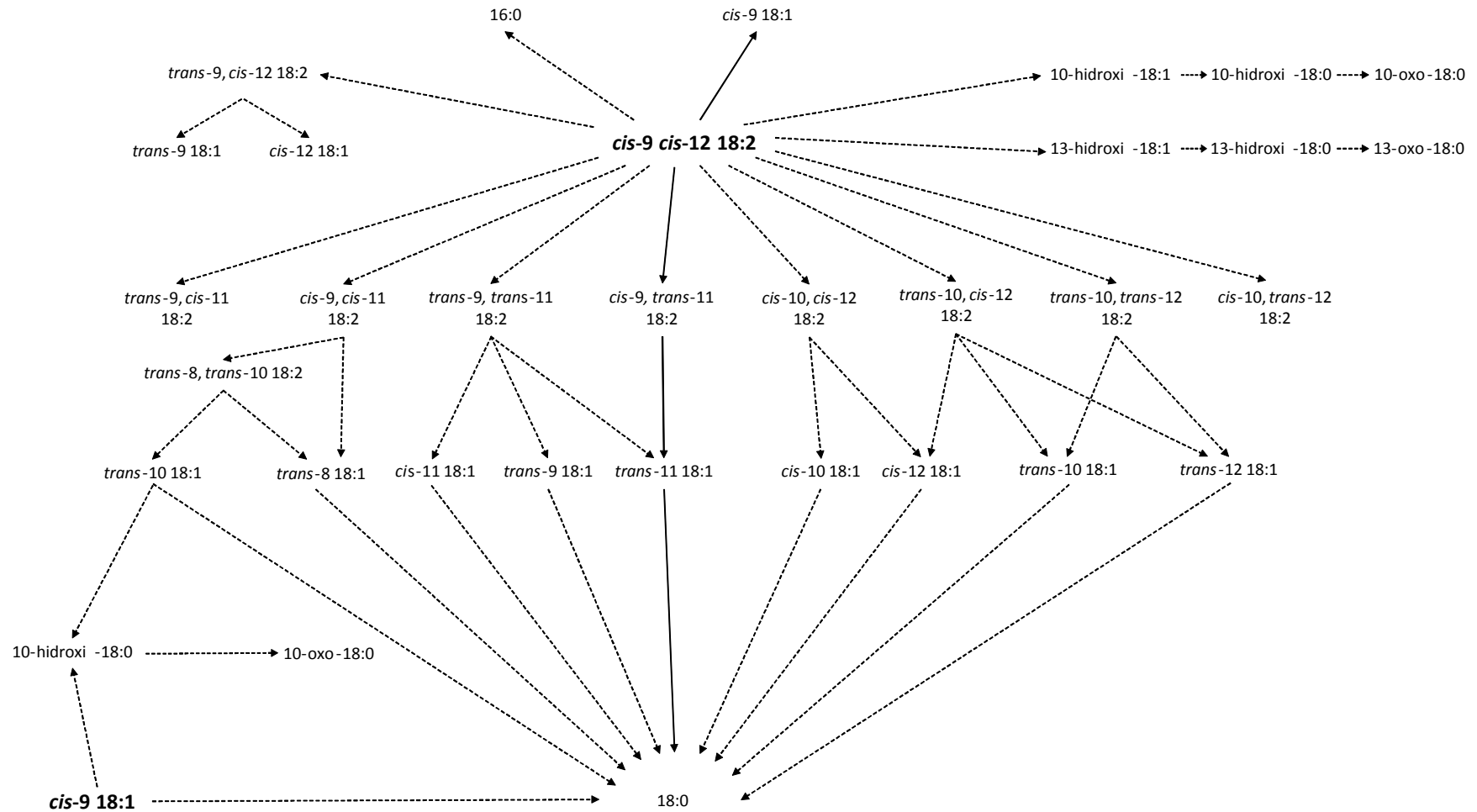


Figura 2. Principales rutas del metabolismo ruminal del *cis-9 18:1* y *cis-9 cis-12 18:2* (adaptado de Castro-Carrera, 2014).

2. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE EL METABOLISMO RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Numerosos trabajos han mostrado que el valor nutricional de la grasa de la leche y la carne puede mejorarse de forma natural y efectiva mediante cambios en la alimentación del ganado (Lock y Bauman, 2004; Doreau et al., 2011). Ello se explica, en gran medida, por el efecto de la composición de la dieta sobre el metabolismo ruminal de los AG, de ahí que en los últimos años se haya prestado especial atención a este aspecto de la nutrición de los rumiantes. La adición de lípidos ricos en AG insaturados a la ración ejerce un fuerte impacto sobre el metabolismo lipídico en el rumen (Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2012). A su vez, algunos estudios han señalado que la adición de taninos a la dieta también puede modificar la BH ruminal, aunque aún son muy escasos los trabajos al respecto (Vasta et al., 2009a; Carreño et al., 2015).

2.1. Suplementación con lípidos de origen marino

Los productos derivados de los rumiantes son fuentes pobres de AG poliinsaturados n-3 de cadena muy larga (como el 20:5n-3 y el 22:6n-3) para la dieta humana. Por ello, un buen número de estudios han intentado enriquecer el contenido de estos AG mediante la inclusión de lípidos de origen marino en la ración de los rumiantes (e. g., aceite de pescado o microalgas marinas; Whitlock et al., 2002; Toral et al., 2010a; Tsiplakou y Zervas, 2013).

No obstante, aunque los lípidos marinos son ricos en 20:5n-3 y 22:6n-3, la eficiencia de la transferencia de estos AG desde la dieta a la leche es relativamente limitada y generalmente más baja en las vacas (aprox. 2-5%) que en las ovejas (hasta el 16%; Lock y Bauman, 2004; Toral et al., 2010b; Tsiplakou y Zervas, 2013). Estas transferencias podrían explicarse, al menos en parte, por su extenso metabolismo en el rumen (Shingfield et al., 2003; Kim et al., 2008). Por ello, también se han investigado alternativas para minimizar el proceso de BH de los AG poliinsaturados, mediante la aplicación de procesos tecnológicos tales como la formación de jabones cálcicos o la encapsulación de lípidos en una envoltura proteica de degradación lenta (Sanz Sampelayo et al., 2002; Kitessa et al., 2003).

En cualquier caso, la investigación sobre la adición de aceites marinos a la dieta se ha dirigido de forma más frecuente hacia su uso como moduladores de la BH ruminal, con el objetivo final de mejorar el contenido de ácido ruménico (*cis-9 trans-11 CLA*) en la leche y la carne. De hecho, se ha visto que, ante un mismo nivel de inclusión en la ración, los aceites de origen marino podrían aumentar de forma más eficaz el contenido lácteo de este isómero del CLA que los aceites vegetales, ya que inhiben el último paso de la BH, impidiendo que el ácido vaccénico (*trans-11 18:1*) se reduzca a ácido esteárico (18:0; Whitlock et al., 2002; Toral et al., 2010c). Como el *cis-9 trans-11 CLA* presente en la leche deriva fundamentalmente de la desaturación mamaria del *trans-11 18:1* (Palmquist et al., 2005; Frutos et al., 2014), el uso combinado de lípidos marinos junto con aceites ricos en ácido linoleico (como sustrato para la formación de vaccénico en el rumen), puede aumentar aún más la concentración de ácido ruménico en la leche (Whitlock et al., 2002; Toral et al., 2010a).

El efecto inhibitor del aceite de pescado y de las microalgas sobre la hidrogenación del *trans-11 18:1* a 18:0 parece explicarse por la acción de los AG poliinsaturados n-3 de cadena muy larga sobre la microbiota del rumen (Boeckert et al., 2008b; Castro-Carrera et al., 2014). Además, este efecto no es específico de este AG, ya que estos suplementos también puede afectar a la saturación de otros isómeros *trans 18:1* menos abundantes (de *trans-4* a *-15 18:1*; Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2010c). En este sentido, cabe destacar que, en algunos estudios en vacas, se ha visto que la suplementación de la dieta con aceite de pescado provoca un incremento rápido de la concentración de *trans-11 18:1* en la grasa de la leche pero que este puede decaer a continuación coincidiendo con un aumento del *trans-10 18:1* (Shingfield et al., 2006; Boeckert et al., 2008a). Sin embargo, parece que estos cambios son de menor entidad en el caso del ovino lechero, al ser menos propenso que el vacuno al cambio de las rutas de BH que conducen a la formación de *trans-10 18:1*. En todo caso, algunos experimentos han mostrado que, en ovejas alimentadas con dietas ricas en alimentos concentrados más lípidos marinos, el porcentaje de *trans-10 18:1* en la leche puede llegar a alcanzar niveles similares al de *trans-11 18:1* (Toral et al., 2010a). En estos casos, la acumulación ruminal de 10-oxo-18:0 es

especialmente importante, observándose valores superiores al 3% del total de AG (Toral et al., 2010c, 2012).

El aceite de pescado y las microalgas también alteran de forma importante la concentración de los AG poliinsaturados con 18 carbonos en el contenido digestivo del rumen, produciéndose un descenso en la abundancia relativa del 18:2n-6 y 18:3n-3 y una acumulación de metabolitos intermedios de la BH de este último, como el *trans*-11 *cis*-15 18:2, *trans*-12 *cis*-15 18:2 y *trans*-11 *trans*-15 18:2 (Shingfield et al., 2003; Or-Rashid et al., 2008; Toral et al., 2012). Esto indica que los lípidos marinos también podrían inhibir otros pasos previos de la BH ruminal. Sin embargo, la suplementación con estos aceites no suele tener efectos sobre la concentración de *cis*-9 *trans*-11 CLA en el contenido digestivo del rumen (Or-Rashid et al., 2008; Toral et al., 2010c). Tampoco se ha observado, por lo general, que los lípidos marinos favorezcan la formación ruminal de *trans*-10 *cis*-12 CLA, que constituye el único AG con efecto antilipogénico confirmado (Shingfield y Griinari, 2007). Este último resultado es muy llamativo, pues el *trans*-10 *cis*-12 CLA se considera el principal responsable de la depresión de la grasa de la leche en vacas alimentadas con dietas ricas en concentrado y aceites vegetales (Harvatine et al., 2009). Por lo tanto, es probable que o bien otros metabolitos intermedios de la BH no identificados o bien otros mecanismos estén involucrados en el síndrome de baja grasa en la leche en respuesta al uso de lípidos marinos en la dieta, tanto en vacas como en ovejas (Shingfield y Griinari, 2007; Toral et al., 2010a,b).

El análisis detallado del contenido digestivo y la leche de rumiantes alimentados con fuentes ricas en 20:5n-3 y 22:6n-3 muestra también la ausencia de metabolitos intermedios con 20 o 22 átomos de carbono con enlaces dobles conjugados (Toral et al., 2010c, 2012; Kairenius et al., 2015). Estos resultados sugieren que el metabolismo ruminal del 20:5n-3 y 22:6n-3 difiere del descrito para el 18:2n-6 y el 18:3n-3, al no iniciarse con la isomerización de un doble enlace, sino con su hidrogenación directa. Todo ello podría estar relacionado con la necesidad de reducir el efecto tóxico de los AG sobre el crecimiento de algunas bacterias ruminales, que podría resultar tanto más potente cuanto más insaturado sea el AG (Maia et al., 2007).

A causa de esta toxicidad sobre la microbiota ruminal, en las décadas pasadas, una de las mayores preocupaciones de los nutricionistas de rumiantes respecto al uso de raciones ricas en lípidos era su posible efecto negativo sobre la digestión ruminal. Aunque algunos estudios parecían indicar que la inclusión de lípidos marinos en la dieta podía reducir la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen y la degradabilidad de la fibra, trabajos posteriores demostraron que estas alteraciones dependen en gran medida de la cantidad de grasa utilizada (Jenkins, 1993; Kucuk et al., 2004). Así, cuando el objetivo final es la modificación del perfil de AG de los productos provenientes de rumiantes, el nivel de inclusión utilizado es, por lo general, demasiado bajo como para perturbar significativamente la fermentación ruminal (Kucuk et al., 2004; Toral et al., 2010c). Es este sentido, por ejemplo, a pesar de que la suplementación con aceite de pescado puede reducir la ingestión de materia seca (MS; Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2010a), esto parece deberse más bien al aumento del flujo de AG insaturados al duodeno que a la supuesta reducción de la degradabilidad de la fibra en el rumen (Shingfield et al., 2003; Kim et al., 2008).

2.2. Suplementación con extractos de taninos

Los taninos son un grupo muy complejo de compuestos secundarios de las plantas que se encuentran en numerosas especies que pueden ser consumidas por los rumiantes. Aunque los taninos son sustancias que no están bien definidas químicamente, se consideran como tal aquellos compuestos fenólicos con una elevada afinidad por otras moléculas, principalmente proteínas, y que poseen pesos moleculares superiores a 500 Daltons (ver revisión de Hervás, 2001).

Convencionalmente, se dividen en dos grandes grupos: taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC). Los TH están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilo se encuentran esterificados con ácidos fenólicos, tales como el ácido gálico o su dímero el ácido elágico. Por su parte, los llamados taninos condensados (o proantocianidinas), son polímeros de hidroxiflavonoles (Figura 3). Los TC están mucho más distribuidos en la naturaleza que los hidrolizables y se encuentran, principalmente, en hojas de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas (Hervás, 2001).

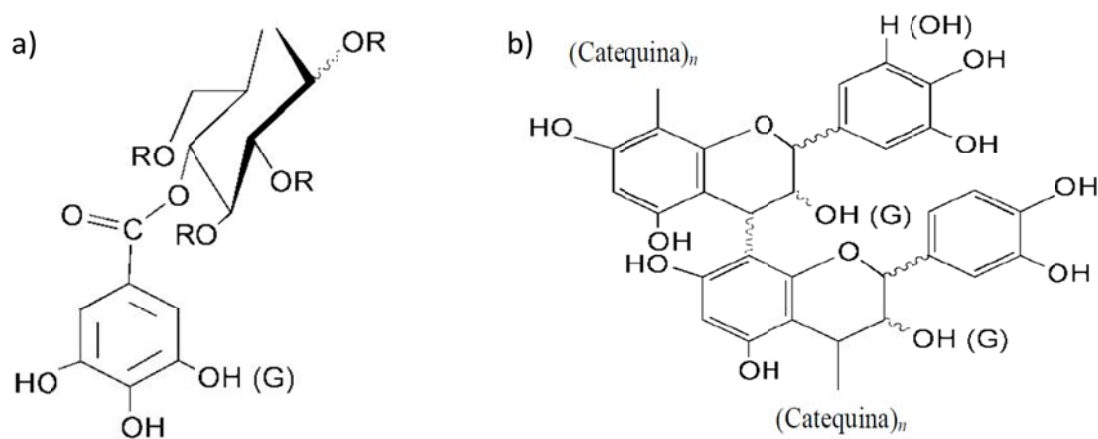


Figura 3. Estructura molecular de (a) un tanino hidrolizable y (b) un tanino condensado (Khanbabaee y van Ree, 2001).

Algunos autores, especialmente en estudios *in vitro* (e. g., Khiaosa-Ard et al., 2009; Vasta et al., 2009a; Buccioni et al., 2011), han señalado que los taninos inhiben el último paso de la BH ruminal de los AG poliinsaturados con 18 átomos de carbono (principalmente, 18:2n-6 y 18:3n-3). Así, de forma análoga a la de la suplementación con lípidos de origen marino, la adición de extractos de taninos a la dieta podría favorecer la acumulación de *trans*-11 18:1 en el rumen, lo que daría lugar posteriormente a un mayor contenido de *cis*-9 *trans*-11 CLA en la leche o la carne (Vasta y Luciano, 2011).

Sin embargo, algunos estudios han señalado que los taninos pueden provocar una inhibición general del proceso de BH ruminal, en lugar del efecto específico sobre el paso de conversión del *trans*-11 18:1 en 18:0 (Benhissi et al., 2013b; Minieri et al., 2014; Carreño et al., 2015). En cualquier caso, hay pocos estudios *in vivo* que hayan podido confirmar estos efectos beneficiosos (Vasta et al., 2009b; Khiaosa-ard et al., 2011) y la mayor parte de los trabajos apuntan en otra dirección (e. g., Benchaar y Chouinard, 2009; Cabiddu et al., 2009). Así, en un ensayo *in vivo* con ovejas lecheras (Torral et al., 2011) no se observó ningún efecto significativo sobre el perfil lipídico de la leche al suplementar la dieta con un 1% de un extracto comercial de taninos extraídos del castaño y del quebracho (1:1). En una prueba posterior (Torral et al., 2013), se incrementó la dosis al 2% y se usó solo el extracto de taninos de quebracho. Los resultados mostraron un aumento del *trans*-11 18:1 y del *cis*-9 *trans*-11 18:2, pero restringido únicamente a los primeros días de tratamiento. En ambos trabajos se

concluyó que los resultados obtenidos no anulaban el uso de taninos para modular la BH, sino que, quizás, el tipo o la dosis elegidos no fueran los más adecuados para conseguir el efecto deseado. A este respecto, la comparación directa de los efectos de cuatro extractos comerciales de taninos (dos condensados: quebracho y uva; y dos hidrolizables: castaño y roble) a cuatro dosis diferentes (2, 4, 6 y 8% de la MS) sobre la composición lipídica del contenido ruminal, mostró que, aunque todos los taninos estudiados eran en mayor o menor medida capaces de modular la BH de los AG, el tratamiento con los efectos más prometedores fue el de taninos de roble a una concentración del 2% de la MS (Carreño et al., 2015).

Tal y como se ha mencionado previamente, los taninos constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo de compuestos fenólicos con diferentes estructuras, lo que repercute en sus propiedades químicas (Mueller-Harvey, 2006). Así, las diferencias en el ratio de procianidina/prodelfinidina, el grado de polimerización, el peso molecular, etc., podrían explicar las grandes variaciones en su habilidad para unirse a otras moléculas o actuar sobre los microorganismos, de ahí las diferencias en su reactividad, incluyendo los efectos relacionados con la BH ruminal. En este sentido, por ejemplo, la inclusión de un extracto de TC de acacia (*Acacia mearnsii*; 7,9% de la MS) inhibió la hidrogenación in vitro del *trans*-11 18:1 a 18:0, mientras que la misma cantidad de taninos de esparceta (*Onobrychis viciifolia*) disminuyó la BH de los ácidos linoleico y linolénico sin afectar al último paso de la BH ruminal (Khiaosa-ard et al., 2009).

En cuanto a la dosis, parece que la actividad degradativa de los microorganismos ruminales se reduce más cuando la concentración de taninos es elevada, lo que podría afectar negativamente al rendimiento productivo de los animales (Aerts et al., 1999). Además, debido a su coste económico, solo las dosis bajas o moderadas de extractos de taninos podrían tener un interés real en alimentación animal. Por ello, aunque se ha observado que la utilización de extractos de taninos a dosis altas (hasta el 16% de la MS; Vasta et al., 2009a) podría modificar de forma positiva la BH ruminal, su aplicación en condiciones prácticas de alimentación parece poco probable.

En cualquier caso, e independientemente de su posible aplicación práctica, tampoco todos los estudios apuntan claramente hacia una mayor capacidad de las

dosis más altas de taninos para modular la BH ruminal, sugiriendo la existencia de interacciones entre los efectos del tipo de extracto y la dosis. Por ejemplo, en el trabajo de Carreño et al. (2015), se observó que solo las dosis más altas de taninos (6 y 8% de la MS) favorecían la acumulación de *cis-9 trans-11* CLA, mientras que las dosis de 2, 4 y 6% permitían aumentar la concentración de AG poliinsaturados totales, 18:2n-6 y 18:3n-3. Por su parte, solo la utilización de quebracho al 8% disminuía la proporción de 18:0 en el contenido ruminal. De forma similar, Buccioni et al. (2011) observaron que el efecto de los taninos sobre el proceso de BH in vitro era, en ocasiones, más marcado con una dosis más baja (4,9 vs. 8,2% MS). Por ello, se necesitarían mayores esfuerzos en investigación para intentar confirmar estos resultados y estudiar el efecto de dosis bajas de extractos de taninos con vistas a su posible aplicación práctica.

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Este trabajo de tesis de máster se planteó con tres objetivos específicos:

1) Estudiar el efecto de la incorporación de dos tipos de taninos (extraídos de la uva y del roble) y de ácidos grasos n-3 de cadena muy larga (procedentes del aceite de pescado) sobre la biohidrogenación ruminal de los AG insaturados.

2) Investigar si los efectos de la adición de aceite de pescado y de taninos de uva o de roble pueden ser aditivos, sinérgicos o incluso antagónicos en la tarea de modular la BH ruminal.

3) Estudiar las consecuencias de los tratamientos con aceite de pescado y taninos de uva o roble sobre la fermentación ruminal. Una vez analizado el potencial de estos compuestos para modificar la BH ruminal, este objetivo es estrictamente necesario para asegurar que no se afecta negativamente un aspecto (la fermentación ruminal) que es determinante de la utilización digestiva de la dieta y, consecuentemente, del rendimiento productivo de los animales.

Para lograr estos objetivos, se llevó a cabo un ensayo in vitro mediante cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y la técnica de producción de gas y se evaluaron los siguientes tratamientos: Control, Roble (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de roble), Uva (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de uva), Pescado (que incluía un 1% de aceite de pescado), Roble+Pescado (combinación de los tratamientos previos con taninos de roble y aceite de pescado) y Uva+Pescado (combinación de los tratamientos previos con taninos de uva y aceite de pescado).

Como donantes del inóculo ruminal para las incubaciones se utilizaron ovejas canuladas en el rumen que fueron alimentadas con una dieta cuya composición era muy similar a la de la dieta utilizada como sustrato en los cultivos.

Los análisis abarcaron la determinación de la composición de ácidos grasos en el contenido ruminal, aspecto clave del estudio, con especial atención a aquellos de mayor interés (e. g., 18:0, *trans*-10 y *trans*-11 18:1, *cis*-9 *trans*-11 CLA, 18:2n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, etc.) y de algunos parámetros indicativos de la fermentación en el rumen (e. g., producción de gas, concentración de amoníaco y producción de ácidos grasos volátiles, etc.).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES EXPERIMENTALES

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en la Nave de Experimentación de Rumiantes del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) y fueron realizados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Como donantes del inóculo ruminal para las incubaciones *in vitro* se utilizaron 3 ovejas adultas, no gestantes ni en lactación, provistas de una cánula ruminal y con un peso vivo medio de $57,7 \pm 5,66$ kg, que pertenecían al rebaño experimental del IGM.

Los animales se alojaron en jaulas individuales y recibieron, durante 3 semanas y en una sola toma diaria (aprox. a las 9.00 h), 37 g MS/kg PV^{0,75} (aprox. 1 mantenimiento; INRA, 2007) de una dieta completa mezclada (TMR) constituida por heno de alfalfa, maíz y cebada en grano, torta de soja, pulpa y melaza de remolacha y vitaminas y minerales (ver Tabla 1). Cuando una oveja dejaba algún pequeño resto, este se le introducía a través de la cánula alrededor de las 19.00 h.

Tabla 1. Ingredientes (g/kg de materia fresca) de la TMR utilizada en las incubaciones *in vitro*.

	TMR
Heno de alfalfa deshidratada	500
Maíz en grano	150
Cebada en grano	108
Torta de soja 44	125
Pulpa de remolacha	58
Melaza de remolacha	42
Sales ¹	15
Vitaminas-Microcorrector ²	2

¹Contiene (g/kg): 556 CaCO₃, 222 Ca₂HPO₄ y 222 NaCl.

²VITAFAC Ovino 0,2% AC (DSM Nutritional Products S.A., España).

Todos los animales dispusieron, durante todo el periodo experimental, de agua fresca y de un bloque corrector vitamínico-mineral (Tegablock; Inatega, España).

Las ovejas se mantuvieron en ayuno desde la tarde anterior hasta el momento de la colección del fluido ruminal. Además, durante la hora previa a la recogida se evitó también el consumo de agua.

2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Como sustrato para las incubaciones se utilizó una TMR 50:50 muy similar a la que se había administrado previamente a las ovejas donantes de los inóculos, cuyos ingredientes se detallan en la Tabla 1. Esta fue secada en una estufa de aire forzado (P-Selecta, España) a 60 °C durante 48 h y después molida a 1 mm de tamaño en un molino centrífugo (Retsch SM 100, Alemania).

Como ya se ha indicado en el apartado previo, los tratamientos experimentales fueron los siguientes:

- Control
- Pescado (que incluía un 1% de aceite de pescado)
- Roble (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de roble)
- Pescado+Roble (combinación de los tratamientos previos con aceite de pescado y taninos de roble)
- Uva (que incluía un 2% de un extracto comercial de taninos de uva)
- Pescado+Uva (combinación de los tratamientos previos con aceite de pescado y taninos de uva).

Los extractos de taninos (roble: *Quercus robur* y *Q. petraea* - Robletan FST; y uva: *Vitis vinifera* - Tanicol VMax) son comercializados por Agrovin S.A. (España), mientras que el aceite de pescado (Afampes 121 DHA) es un producto de la empresa Afamsa (España).

3. CULTIVOS DISCONTINUOS DE MICROORGANISMOS RUMINALES Y TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS

Para este estudio, se realizaron 3 incubaciones in vitro en 3 días diferentes utilizando la técnica de producción de gas y cultivos discontinuos de microorganismos ruminales (Williams, 2000; Hervás et al., 2005).

Un primer set de botellas (45 en total) se utilizó para el estudio de los parámetros de la fermentación ruminal [(3 tandas × 6 tratamientos × 2 botellas/tratamiento) + (3 tandas × 1 blanco × 2 botellas/blanco) + (3 tandas × 1 botella de “tiempo 0”)]. Además, para estudiar la biohidrogenación ruminal de los ácidos

grasos se utilizó un segundo set de otras 36 botellas (3 tandas × 6 tratamientos × 1 botella/tratamiento × 2 tiempos).

Antes de iniciar las incubaciones, se preparó el medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970), cuya composición se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del medio de cultivo.

Soluciones (compuestos químicos)		Solución final (ml/l)	Concentración parcial (/l)
Solución tampón		208,1	
NH ₄ HCO ₃	(g)		4,00
NaHCO ₃	(g)		35,00
Solución reductora		0,1	
Cisteína-HCl	(g)		6,25
NaOH 1M	(ml)		40,00
Na ₂ S·9 H ₂ O	(g)		6,25
Solución de macrominerales		208,1	
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	(g)		9,45
KH ₂ PO ₄	(g)		6,20
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	(g)		0,60
Solución de microminerales		62,4	
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	(g)		1,32
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	(g)		1,00
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	(g)		0,10
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	(g)		0,80
Solución de resazurina		1,04	
Resazurina	(g)		0,01

Este medio de cultivo se mantuvo en un baño de agua a 39,5 °C durante aproximadamente 60 minutos y se gaseó constantemente con CO₂. Su pH se redujo a aproximadamente 6,7 con ácido ortofosfórico al 85%.

Mientras terminaba de prepararse el medio, se recogió líquido ruminal de cada una de las tres ovejas (250 ml/animal), se filtró utilizando dos capas de gasa y se llevó rápidamente al laboratorio en termos, para intentar conservar sus condiciones de anaerobiosis y temperatura. Una vez en el laboratorio y gaseando siempre con CO₂, los inóculos se filtraron de nuevo a través de una membrana de nailon (400 µm; Fisher-Scientific S.L., España). Después, una mezcla proporcional de los tres se mezcló con el medio de cultivo en una proporción 1:4 (v/v; fluido ruminal/medio de cultivo).

La adición de los suplementos (tanto los aceites como los taninos) se realizó justo antes de comenzar las incubaciones in vitro. En el caso de los aceites, éstos fueron

disueltos en etanol (1,2 g de aceite de pescado o 2,4 g de aceite de girasol en 24 ml de etanol al 96%) y sonicados a 100 A durante 3 ciclos de 10 segundos (Ultraschallprozessor UP200H, Alemania) y después dosificados (100 µl por botella). Es importante señalar que la dieta base incluyó también un 2% de aceite de girasol, para disponer de una cantidad adecuada de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (especialmente ácido linoleico) sobre los que realizar los estudios acerca de la acción de los taninos y los lípidos marinos. Por su parte, los taninos se solubilizaron en agua templada (500 mg en 5 ml a 40 °C) y después 100 µl de la solución correspondiente se dosificaron en las botellas de incubación. A los blancos se les añadieron únicamente los 100 µl de etanol.

En cada una de las botellas de incubación (125 ml), en las que previamente se habían pesado 500 mg de la TMR empleada como sustrato, se adicionó el aceite de girasol y a continuación los tratamientos correspondientes (i. e., aceite de pescado, taninos o ambos) y se dosificó una mezcla de 10 ml de fluido ruminal y 40 ml de medio de cultivo. Por último, las botellas se cerraron herméticamente con tapones de caucho y anillas de aluminio y se introdujeron en un incubador (Memmert UFP 500, Alemania) a 39,5 °C.

3.1. Parámetros indicativos de la fermentación ruminal

La producción de gas se registró a las 6, 12 y 24 horas de incubación mediante un transductor de presión (Gems Sensors 2200, Reino Unido) conectado a una pantalla (Data Track Process Instruments 223, Reino Unido). La presión (psi) se midió pinchando cada botella con una aguja de 0,6 mm de diámetro (Sterican B. Braun, España) conectada al transductor. Tras cada medida, se permitió la salida de todo el gas acumulado en las botellas; luego estas se agitaron y se volvieron a depositar en el incubador hasta la próxima lectura.

Los valores de presión se corrigieron tanto para la cantidad de materia orgánica (MO) incubada como para la producción de gas de los blancos y a partir de ellos se estimó el volumen de gas producido. Para ello, se utilizó una ecuación de regresión lineal entre el volumen y la presión generada a partir de numerosas medidas simultáneas de ambos parámetros (Hervás et al., 2005).

Tras 24 horas de incubación, las botellas se sumergieron en agua y hielo picado para detener la fermentación. Inmediatamente después, se midió el pH (Crison Instruments GLP-22, España), se tomaron 10 ml de líquido y se centrifugaron (3000 rpm, 10 min, 4 °C; Eppendorf 5415C, España). Del sobrenadante de cada muestra, se recogieron 4 ml y se acidificaron con 4 ml de HCl 0,2 M para la determinación de amoníaco. Otros 2 y 0,8 ml se usaron, respectivamente, para analizar el ácido láctico y los AGV. En el caso de estos últimos, se fijaron con una solución desproteinizante (20 g de ácido metafosfórico disueltos en 0,5 ml de HCl 0,5 M) que contenía ácido crotónico como patrón interno (4 g/l). Todas las muestras se mantuvieron a -30 °C hasta el momento de los análisis.

El resto del contenido de cada botella se filtró utilizando crisoles de porosidad 1 (100-160 µm; Pyrex, Reino Unido), una bomba de vacío (KNF Neuberger VDE 0530, Alemania) y un baño de ultrasonidos (P-Selecta, España) cuando fue necesario. Para estimar la desaparición de materia seca (DMS), los crisoles se secaron en una estufa de aire forzado a 103 °C durante 24 horas y para estimar la digestibilidad verdadera in vitro (ivDV; Frutos et al., 2004) se analizó el contenido de fibra neutro detergente (Van Soest et al., 1991) de los residuos.

3.2. Biohidrogenación ruminal

En las botellas destinadas a estudiar la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos, el proceso fue muy similar, de modo que estas se sumergieron en agua y hielo picado a las 0 y 12 horas post-incubación para detener la fermentación (o impedir la, en el caso de las botellas de la hora 0). A continuación se congelaron a -80 °C y, posteriormente, se liofilizaron (FTS LyoStar, Estados Unidos). Después, el residuo se homogenizó y se conservó de nuevo a -80 °C hasta su análisis.

4. ANÁLISIS QUÍMICOS

4.1. Alimentos

El análisis químico convencional de los alimentos se realizó en los laboratorios del Dpto. de Nutrición y Producción de Herbívoros del IGM, los cuales están acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005; Acreditación ENAC N.º 907/LE1609).

El contenido de materia seca (MS) se determinó por desecación en una estufa de aire forzado (P Selecta, España) a 103 °C hasta peso constante (ISO 6496:1999). Posteriormente, la muestra seca se quemó en un horno-mufla (Hobersal 12-PR/400, España) a 550 °C durante 6 horas para determinar el contenido de cenizas (ISO 5984:2002).

Los contenidos de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) se determinaron secuencialmente en un analizador Ankom²⁰⁰⁰ (Ankom Technology Corp., Estados Unidos), de acuerdo con la metodología descrita por Van Soest et al. (1991) y las adaptaciones realizadas por Ankom (<https://ankom.com>).

Los análisis de nitrógeno (N) se realizaron en un autoanalizador Kjeltec (Foss KjeltecTM 2400, Suecia) con sulfato potásico y sulfato cúprico como catalizadores (ISO 5983-2:2009). Para calcular el contenido de proteína bruta (PB) se usó el factor de conversión 6,25 ($PB = 6,25 \times N$).

Para analizar el extracto etéreo (EE) se empleó el sistema Ankom (*Ankom Filter Bag Technology*) y la técnica descrita por la AOCS (2008; Procedure Am 5-04).

4.2. Amoníaco, lactato y ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV (acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, isobutírico e isovalérico) se analizó por cromatografía de gases (Carro et al., 1999) en el Departamento de Producción Animal de la Universidad de León.

Los análisis de lactato se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Taylor (1996). La concentración del ácido láctico se estimó por colorimetría a partir de una curva patrón realizada con una solución de ácido L(+)-láctico (Sigma-Aldrich, Alemania).

Los análisis de amoníaco se realizaron por colorimetría de acuerdo con el método del salicilato descrito por Reardon et al. (1966). Como patrón se utilizó una solución de cloruro de amonio 100 mM (Sigma-Aldrich, Alemania).

4.3. Ácidos grasos de cadena larga

Para los análisis del perfil lipídico del contenido digestivo, que se realizaron mediante cromatografía de gases, se siguió la metodología descrita por Shingfield et al. (2003).

La preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se llevó a cabo mediante el procedimiento de extracción-transesterificación con cloroformo y ácido sulfúrico mezclado con metanol. Para la cuantificación del contenido de ácidos grasos, se utilizó *cis*-12 13:1 (Larodan Fine Chemicals, Suecia) como estándar interno. Los lípidos de 200 mg de muestra liofilizada se extrajeron con 4 ml de una mezcla de hexano:2-propanol (3:2, v/v), tras ajustar el pH de la digesta a 2 con HCl 2 M. Posteriormente, el extracto orgánico se evaporó bajo corriente de N a 50 °C. A continuación, los lípidos disueltos en 2 ml de hexano se metilaron (i. e., se transformaron en FAME) mediante una transesterificación ácido-básica con metóxido de sodio 0,5 M en metanol, de 5 minutos a 20 °C, seguida de una reacción con una solución al 1% de ácido sulfúrico en metanol a 50 °C durante 30 minutos.

Para la preparación de los FAME de los henos y los aceites se siguió el procedimiento de extracción y transesterificación en una etapa utilizando cloroformo (Sukhija y Palmquist, 1988) y 20 ml/l de ácido sulfúrico en metanol (Shingfield et al., 2003).

Para la determinación de los FAME se usó un cromatógrafo de gases (GC, Agilent 6890N, Estados Unidos) equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar CP-Sil 88 (100 m × 0,25 mm; 0,20 µm; Varian, Holanda). Se utilizó hidrógeno como gas portador, aire sintético e hidrógeno como combustible y helio como gas auxiliar.

En el GC se inyectaron 2 µl con un *split* de 1:50 y se programó el gradiente de temperatura descrito en Shingfield et al. (2003). En el caso de los isómeros 18:1 se realizó otro análisis en condiciones isotermas a 170 °C para mejorar la separación y posterior identificación de los picos (Shingfield et al., 2003).

Los picos cromatográficos de los distintos FAME fueron identificados gracias a una mezcla de estándares comerciales (Larodan Fine Chemicals, Suecia; Nu-Chek Prep

Inc., Estados Unidos; Sigma-Aldrich, Alemania) y por comparación con muestras verificadas previamente mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) de los derivados 4,4-dimetiloxazolinicos (DMOX; e. g., Toral et al., 2010c).

Los AG identificados fueron los siguientes (en el orden correspondiente a los tiempos de retención): 12:0, 13:0 *iso*, 13:0 *anteiso*, 13:0, 14:0 *iso*, *cis*-12 13:1 (estándar interno), 14:0, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 15:0, *trans* 15:1, 16:0 *iso*, 16:0, *trans*-9 16:1, 17:0 *iso*, *cis*-6+7 16:1, 16:1 (geometría del doble enlace no determinada), *cis*-9 16:1, 17:0 *anteiso*, 3,7,11,15-tetrametil-16:0, *cis*-14 16:1, 17:0, 18:0 *iso*, 18:0, *trans*-4 18:1, *trans*-5 18:1, *trans*-6+7+8 18:1, *trans*-9 18:1, *trans*-10 18:1, *trans*-11 18:1, *trans*-12 18:1, *trans*-13+14 18:1, *cis*-9 18:1, *cis*-10 + *trans*-15 18:1, *cis*-11 18:1, *cis*-12 18:1, *cis*-13 18:1, *trans*-16 + *cis*-14 18:1, 10,14 18:2, *cis*-15 18:1, *trans*-11 *trans*-15 18:2, *trans*-9 *trans*-12 18:2, 18:2 (geometría de los dobles enlaces no determinada), *cis*-9 *trans*-12 18:2, *cis*-16 18:1, *trans*-9 *cis*-12 18:2, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 *cis*-12 18:2, 20:0, 18:3n-6, suma de isómeros 20:1 no resueltos, 18:3n-3, *cis*-11 20:1, *cis*-9 *trans*-11 CLA, *trans*-9 *cis*-11 CLA, *trans*-10 *cis*-12 CLA, 21:0, *trans*-11 *trans*-13 CLA, suma de *trans*-8 *trans*-10, *trans*-9 *trans*-11 y *trans*-10 *trans*-12 CLA no resueltos, 20:2n6, 22:0, 20:3n-3 (+ 22:1, geometría del doble enlace no determinada), *cis*-13 22:1, 20:4n-6, 23:0, 20:4n-3, 20:5n-3, 24:0, 22:3n-6, *cis*-15 24:1, 22:4n-6, 22:5n-6, 22:5n-3, 22:6n-3, 10-oxo-18:0 y 13-oxo-18:0.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los parámetros de fermentación ruminal se estudiaron mediante un análisis de varianza de una vía utilizando el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS (versión 9.4; SAS Inst. Inc., Estados Unidos). El modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento experimental y la tanda anidada al tratamiento como efecto aleatorio. En el análisis del contenido de AG tras 12 horas de incubación, el modelo incluyó el efecto fijo del tratamiento experimental y los datos obtenidos a las 0 horas como covariable, considerando como efecto aleatorio la tanda anidada al tratamiento.

Se admitieron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con un nivel de significación de $P < 0,05$ y se consideró la $P < 0,10$ como una tendencia a la significación.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPOSICIÓN DE LA TMR Y LOS ACEITES

La composición química de la TMR se presenta en la Tabla 3. Al tratarse de una dieta rica en alimentos concentrados formulada para animales en lactación, los contenidos de proteína bruta fueron altos (189 g/kg MS). La concentración media de FND, FAD y extracto etéreo fue de 274, 179 y 26 g/kg MS.

Tabla 3. Composición química (g/kg MS, excepto para la propia MS que es g/kg de materia fresca) de la TMR utilizada en las incubaciones in vitro.

	TMR
Materia seca	957
Materia orgánica	889
Proteína bruta	189
Fibra neutro detergente	274
Fibra ácido detergente	179
Extracto etéreo	26

Tal y como se muestra en la Tabla 4, el principal AG de la TMR fue el ácido linoleico, que representó casi un tercio del total, seguido por los ácidos palmítico, linolénico y oleico (22, 21 y 12% de los AG totales, respectivamente). El aceite de girasol fue especialmente rico en 18:2n-6 (61%) y *cis*-9 18:1 (25%), mientras que el de pescado mostró una composición más compleja. Entre los principales AG de este último, destacan los poliinsaturados n-3 de cadena muy larga, que constituyeron un 29% del total. Todos estos valores se encuentran dentro del rango normal observado para este tipo de alimentos en estudios previos (e. g., Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2010a, 2010c).

2. BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS

La adición de aceite de pescado dio lugar a una reducción de la concentración de 18:0 en el contenido digestivo, junto a un marcado aumento de las de algunos isómeros *trans* 18:1 ($P < 0,05$; Tabla 5), lo que apoya los resultados de otros estudios que indican que los aceites de origen marino inhiben de forma específica el último paso de la BH ruminal (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; Toral et al., 2012). No obstante, resulta interesante que, en el presente experimento, dicha inhibición condujo a la

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (g/100 AG totales) de la TMR y los aceites de girasol y de pescado utilizados en las incubaciones.

	TMR	Ac. girasol ¹	Ac. pescado ²
14:0	1,8	0,1	3,3
16:0	22,2	6,5	19,4
18:0	4,7	3,9	5,7
<i>cis</i> -9 18:1	11,8	24,8	16,3
<i>cis</i> -11 18:1	1,0	1,6	3,1
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	31,8	61,3	2,1
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	21,4	<0,1	0,8
20:5n-3	n.d. ³	n.d.	6,0
22:5n-3	n.d.	n.d.	1,5
22:6n-3	n.d.	n.d.	21,4

¹Carrefour S.A. (España).²Afampes 121 DHA - Afamsa (España).³No detectado.

acumulación de isómeros *trans* 18:1 minoritarios (*trans*-9, -10 y -12 18:1), sin que hubiera cambios significativos en la de *trans*-11 18:1, el metabolito 18:1 más abundante en el contenido digestivo ruminal ($P>0,10$; Figura 4). También se observó un aumento del isómero *trans*-11 *trans*-15 18:2, que sugiere que el aceite de pescado podría inhibir pasos previos de la BH ruminal, lo que coincide con algunos trabajos in vivo (Boeckert et al., 2008b; Toral et al., 2010c). Ahora bien, la ausencia de efectos sobre el ácido vaccénico contrastaría con lo señalado en experimentos llevados a cabo en vacas y ovejas lecheras (e. g., Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2010a). Así, en estos últimos se ha observado que la suplementación de la dieta con lípidos marinos provoca un gran incremento inicial de la concentración de *trans*-11 18:1 en la grasa de la leche, que parece decaer a continuación coincidiendo con aumentos del *trans*-10 18:1. Las razones que explicarían las diferencias entre los cambios en el perfil isomérico de los *trans* 18:1 en esta prueba y en dichos experimentos in vivo no son evidentes, aunque es posible que algunas variaciones en la BH ruminal en respuesta al uso de aceites marinos tengan lugar tras periodos de tiempo más largos (i. e., superiores a las horas de incubación). No obstante, resultados previos de estudios in vitro (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; Chow et al., 2004) también sugerían que la inhibición del último paso de la BH tendría como resultado una mayor acumulación de *trans*-11 18:1 en el contenido digestivo.

Tabla 5. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos con 18 átomos de carbono en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.

	Control	Pescado	Roble	Pescado+Roble	Uva	Pescado+Uva	eed ¹	P ²
18:0	18,62 ^a	14,49 ^c	16,94 ^{ab}	15,30 ^{bc}	16,82 ^{ab}	15,52 ^{bc}	0,971	*
10-oxo-18:0	0,06	0,12	0,07	0,10	0,07	0,11	0,024	ns
<i>cis</i> -9 18:1	2,46	2,58	2,43	2,98	2,58	3,16	0,356	ns
<i>cis</i> -11 18:1	0,52 ^b	0,68 ^a	0,54 ^b	0,71 ^a	0,56 ^b	0,76 ^a	0,053	**
<i>trans</i> -9 18:1	0,15 ^b	0,31 ^a	0,13 ^b	0,28 ^a	0,15 ^b	0,32 ^a	0,035	***
<i>trans</i> -10 18:1	0,21 ^b	0,44 ^a	0,22 ^b	0,40 ^a	0,26 ^b	0,44 ^a	0,068	**
<i>trans</i> -11 18:1	3,82	4,38	4,13	4,20	4,28	4,73	0,531	ns
<i>trans</i> -12 18:1	0,32 ^b	0,57 ^a	0,31 ^b	0,54 ^a	0,34 ^b	0,61 ^a	0,056	***
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	1,99	1,77	1,41	2,23	1,64	2,04	0,471	ns
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA ³	0,18	0,15	0,34	0,18	0,29	0,30	0,125	ns
<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11 CLA	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,011	ns
<i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 CLA	0,07	0,07	0,09	0,07	0,09	0,11	0,022	ns
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	0,08	0,16	0,13	0,12	0,13	0,16	0,031	ns
<i>trans</i> -11 <i>trans</i> -15 18:2	0,16 ^c	0,19 ^{ab}	0,17 ^c	0,21 ^a	0,17 ^{bc}	0,20 ^{ab}	0,013	**
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	0,16	0,16	0,16	0,22	0,17	0,21	0,054	ns

^{a-c}Para cada ácido graso, valores medios con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0.05).

¹eed= error estándar de la diferencia.

²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001.

³CLA= ácido linoleico conjugado.

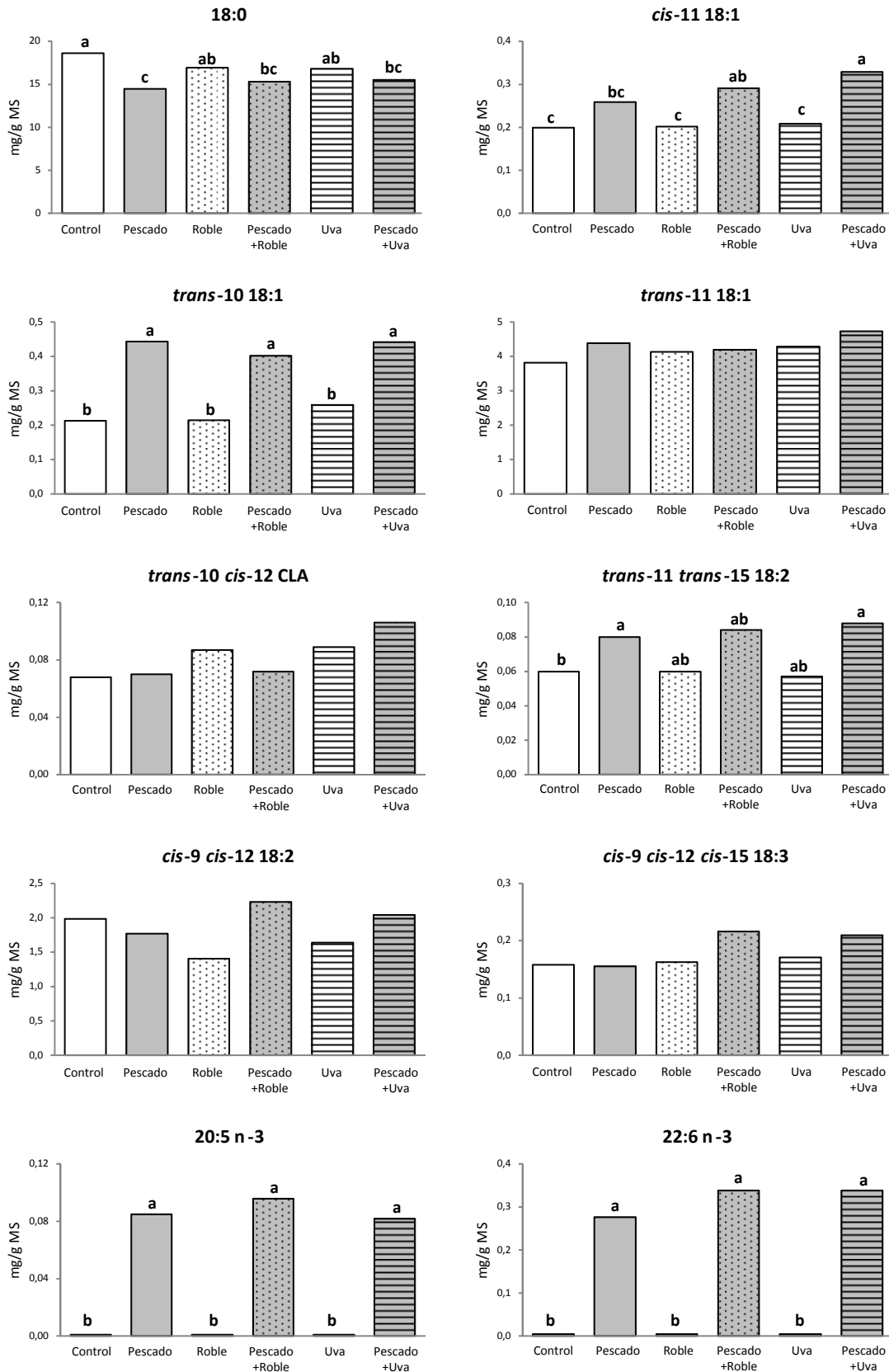


Figura 4. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.

Tal y como cabía esperar, la concentración de AG 18:2 conjugados en el contenido digestivo fue relativamente baja en el caso de la dieta control y no se vio alterada por la inclusión de aceite de pescado ($P>0,10$), lo cual coincide con resultados previos en ovejas y vacas que recibían lípidos marinos (Lee et al., 2008; Toral et al., 2010c). En este sentido, se sabe que los grandes aumentos de la concentración de *cis*-9 *trans*-11 CLA en la leche asociados a este tipo de estrategia nutricional están más relacionados con una mayor síntesis endógena de ácido ruménico en la glándula mamaria (Palmquist et al., 2005) que con un aumento del flujo de *cis*-9 *trans*-11 CLA desde el rumen. Respecto al *trans*-10 *cis*-12 CLA, los estudios en vacuno y ovino han mostrado que el aceite de pescado, por lo general, tampoco promueve la acumulación de este isómero del CLA en el rumen (Shingfield et al., 2003; Lee et al., 2008; Toral et al., 2010c), cuyo efecto antilipogénico no parece, por lo tanto, relacionado con la depresión de la grasa de la leche con el uso de lípidos marinos (Shingfield y Griinari, 2007; Toral et al., 2010a). Tampoco hubo cambios en la concentración de *trans*-9 *cis*-11 CLA ($P>0,10$), otro de los isómeros del CLA con posible efecto inhibidor de la síntesis de grasa, lo que apoyaría la hipótesis de la implicación de otros metabolitos intermedios de la BH en el síndrome de baja grasa en la leche en respuesta a la alimentación con aceites marinos (Toral et al., 2010a; Kairenius et al., 2015). Uno de estos posibles candidatos es el 10-oxo-18:0, producto de la hidratación y posterior oxidación de los AG insaturados en el rumen (Jenkins et al., 2008). Aunque algunos estudios han mostrado grandes aumentos de su concentración ruminal con dietas ricas en AG poliinsaturados n-3 de cadena muy larga (Toral et al., 2010c, 2012), en el presente experimento no se observaron cambios significativos con los tratamientos que contenían aceite de pescado ($P>0,10$).

Respecto al empleo de extractos de taninos en la dieta de rumiantes, algunos trabajos *in vitro* habían señalado un efecto similar al de los lípidos marinos y la consiguiente acumulación ruminal de ácido vaccénico en detrimento del esteárico (Khiaosa-ard et al., 2009; Vasta et al., 2009a). Sin embargo, otros habían detectado una inhibición más general del proceso de BH, que conducía a la acumulación de los AG insaturados procedentes de la dieta, sin que hubiera un efecto específico sobre ninguno de sus pasos (Benhissi et al., 2013b; Minieri et al., 2014). Estos resultados

aparentemente contradictorios podrían atribuirse en gran medida a diferencias en el tipo y en las dosis de taninos utilizadas (Khiaosa-ard et al., 2009; Buccioni et al., 2011). En el presente estudio, la suplementación con extractos de taninos de roble o de uva (solos o en combinación con el aceite de pescado) no consiguió ni inhibir la BH ruminal de los *trans* 18:1 ni favorecer la acumulación de 18:2n-6 o 18:3n-3 en el contenido digestivo ($P>0,10$; Figura 4). Esto fue totalmente inesperado ya que, en un trabajo previo llevado a cabo con la misma metodología *in vitro* (Carreño et al., 2015), tratamientos muy similares (i. e., suplementación con estos extractos de roble o uva al 2% MS) a una TMR también suplementada con aceite de girasol modificaron de forma positiva la BH de los AG. Resulta muy difícil establecer las causas que permitan explicar esta discrepancia. En todo caso, dado que el efecto de los taninos estaría probablemente mediado por cambios en la microbiota ruminal (Vasta et al., 2010; Carreño et al., 2015), podría especularse que sea debida a diferencias individuales que pudieran determinar en cierta medida la respuesta a la utilización de dosis bajas de taninos.

En relación con este punto, la administración de estos compuestos fenólicos no alteró significativamente la concentración de AG impares y ramificados ($P>0,10$), con la única excepción del pequeño aumento en la de 17:0 con el uso combinado de taninos de uva y aceite de pescado ($P<0,05$; Tabla 6). Dado que la presencia de estos AG en el rumen derivaría de su síntesis por la microbiota, y por ello se han empleado como biomarcadores microbianos (Fievez et al., 2012), los limitados efectos de los taninos a este nivel podrían sugerir que las poblaciones bacterianas del rumen apenas se vieron afectadas.

Por último, y como lógicamente se esperaba, el empleo de aceite de pescado aumentó notablemente la concentración de 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3 en el contenido digestivo ($P<0,001$; Tabla 6), al ser este suplemento lipídico una fuente rica de dichos AG poliinsaturados n-3 (Tabla 4). El aumento del *cis*-11 18:1 también se explicaría en parte por su aporte con el aceite de pescado. Por otro lado, la utilización conjunta de aceite de pescado y extractos de taninos no causó diferencias importantes en la concentración de estos AG insaturados, a excepción del aumento de la de *cis*-11 18:1

Tabla 6. Concentraciones (mg/g MS) de diversos ácidos grasos (AG) ramificados, impares y poliinsaturados n-3 de cadena muy larga en el contenido ruminal tras 12 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.

	Control	Pescado	Roble	Pescado+Roble	Uva	Pescado+Uva	eed ¹	P ²
15:0	0,24	0,25	0,25	0,26	0,25	0,30	0,031	ns
15:0 <i>iso</i>	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,07	0,015	ns
15:0 <i>anteiso</i>	0,11	0,12	0,14	0,11	0,14	0,16	0,034	ns
17:0	0,25 ^b	0,24 ^b	0,24 ^b	0,26 ^{ab}	0,24 ^b	0,28 ^a	0,013	*
17:0 <i>anteiso</i>	0,09	0,11	0,12	0,11	0,12	0,14	0,024	ns
suma AG impares	0,72	0,76	0,74	0,75	0,72	0,83	0,074	ns
suma AG ramificados	0,53	0,60	0,63	0,60	0,63	0,74	0,118	ns
20:5n-3	<0,01 ^b	0,09 ^a	<0,01 ^b	0,10 ^a	<0,01 ^b	0,08 ^a	0,023	***
22:5n-3	<0,01 ^c	0,03 ^b	<0,01 ^c	0,04 ^a	<0,01 ^c	0,04 ^a	0,004	***
22:6n-3	<0,01 ^b	0,28 ^a	<0,01 ^b	0,34 ^a	<0,01 ^b	0,34 ^a	0,046	***

^{a-c}Para cada ácido graso, valores medios con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0.05).

¹eed= error estándar de la diferencia.

²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); *, P<0,05; ***, P<0,001.

en el tratamiento Pescado+Uva. Ello coincide con lo observado por otros autores al administrar extractos de taninos (Khiaosa-ard et al., 2009; Buccioni et al., 2011) y podría deberse a una inhibición en la hidrogenación ruminal de este isómero 18:1, que parece tener lugar por la acción de las bacterias implicadas en la saturación de los AG *trans*-18:1 (Jenkins et al., 2008). Aunque se cree que el número de poblaciones bacterianas capaces de llevar a cabo este último paso de la BH podría ser reducido (Jenkins et al., 2008; Lourenço et al., 2010), se desconoce aún si, dentro de estas, existe algún tipo de especificidad en el tipo de isómeros que serían capaces de transformar en 18:0. De ser así, quizás explicaría el aumento de la concentración de *cis*-11 18:1 en ausencia de cambios en otros metabolitos 18:1. La composición del sustrato incubado, que contenía aceite girasol, también podría haber influido en los resultados obtenidos, ya que en un estudio previo en el que se añadieron taninos a una dieta suplementada con aceites de soja o lino (Minieri et al., 2014), la acumulación de *cis*-11 18:1 tuvo lugar únicamente cuando se utilizó el suplemento rico en 18:2n-6. En este sentido, la incubación de fluido ruminal con ¹³C-18:2n-6 demostró que este isómero *cis* 18:1 puede constituir uno de los principales metabolitos 18:1 durante el proceso de BH del ácido linoleico (Lee y Jenkins, 2011).

3. FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO

Aunque actualmente ya se sabe que el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal depende de su tipo y de la dosis utilizada (Aerts et al., 1999; Frutos et al., 2004), aún existe la idea generalizada de que los aceites de origen marino perjudican este proceso (Jenkins, 1993; Fievez et al., 2003). Sin embargo, en el presente estudio, los parámetros indicativos de la fermentación ruminal estudiados no se vieron alterados de forma significativa por la administración de aceite de pescado o de taninos (Tabla 7). Así, los suplementos utilizados no afectaron ni al pH ni a las concentraciones medias de amoníaco, ácido láctico o AGV en el rumen ($P > 0,10$). Tampoco hubo evidencia de que se produjeran cambios significativos en las proporciones molares de AGV y únicamente la concentración media de isoácidos mostró una tendencia ($P < 0,10$) a ser menor con ambas combinaciones de aceite de pescado más taninos. La relación molar de acetato:propionato no se vio afectada por ninguno de los tratamientos utilizados ($P > 0,10$).

Tabla 7. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco y lactato, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de pescado, taninos o ambos.

	Control	Pescado	Roble	Pescado+Roble	Uva	Pescado+Uva	eed ¹	P ²
Gas (ml/g MO)	294	299	289	289	287	278	13,4	ns
DMS (%)	72,8	69,2	69,5	65,7	70,5	65,1	3,06	ns
ivDV (%)	79,4 ^a	77,4 ^{ab}	77,4 ^b	76,5 ^b	78,1 ^{ab}	76,6 ^b	0,92	t
pH	6,54	6,51	6,52	6,50	6,52	6,53	0,090	ns
Amoniaco (mg/l)	518	523	484	498	484	500	34,5	ns
Lactato (µg/l)	6,52	6,80	6,10	5,55	6,98	6,71	0,652	ns
AGV total (mmol/l)	63,5	65,7	61,9	63,3	63,3	63,6	5,10	ns
<i>Proporciones molares</i>								
Acético	66,7	66,9	67,1	67,4	67,0	67,6	1,49	ns
Propiónico	14,5	14,2	14,0	14,2	14,5	14,8	0,91	ns
Butírico	13,9	14,2	14,6	14,3	14,1	13,6	0,47	ns
Valérico	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,5	0,14	ns
Isoácidos	3,1 ^a	2,9 ^{ab}	2,7 ^{ab}	2,6 ^b	2,7 ^{ab}	2,5 ^b	0,21	t
Relación A/P	4,59	4,74	4,79	4,80	4,63	4,62	0,392	ns

^{a,b}Para cada parámetro, valores medios con diferentes superíndices tienden a diferir significativamente (P<0,10).

¹eed= error estándar de la diferencia.

²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); t, P<0,10.

En el vacuno, el uso de aceite de pescado puede alterar los parámetros indicativos de la fermentación ruminal y causa con frecuencia un aumento de la proporción molar de propionato a costa de la reducción del acetato, del butirato o de ambos AGV lipogénicos (Keady y Mayne, 1999; Shingfield et al., 2003). En las ovejas, por el contrario, se ha visto que aunque la relación molar de acetato:propionato se puede reducir en algunos casos por el aceite de pescado, en otros permanece inalterada (Fievez et al., 2003; Toral et al., 2010c), lo que coincide con los resultados del presente estudio. Por lo que respecta a la proporción de ácido butírico, el efecto del aceite de pescado parece ser muy variable, habiéndose observado tanto reducciones como aumentos o ausencia de cambios, lo mismo en vacas que en ovejas (Keady y Mayne, 1999; Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2009). Aunque la explicación de estas variaciones inter- e intraespecíficas aún no está clara, se cree que podría estar relacionada con cambios selectivos en la comunidad microbiana del rumen (Jenkins et al., 2008).

Por su parte, la baja dosis de taninos utilizada podría explicar la ausencia de efectos sobre los parámetros estudiados, ya que ni siquiera se modificó la concentración de amoníaco, que generalmente es el indicativo más evidente del efecto de estos polifenoles sobre la proteólisis en el rumen (Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006). No obstante, sí se detectó un descenso en la concentración de isoácidos con ambas combinaciones de taninos y aceite de pescado, lo cual podría reflejar un efecto negativo sobre la degradación de la proteína (Barahona et al., 2003).

La suplementación con aceite de pescado o taninos no afectó ($P>0,10$) a la producción de gas in vitro, con un valor medio de 289 ml/g MO a las 24 h. La desaparición de MS para este tiempo de incubación alcanzó 688 g/kg y tampoco varió con los tratamientos utilizados ($P>0,10$). Por su parte, los valores de digestibilidad verdadera in vitro tendieron a ser significativamente menores en los tratamientos Roble, Pescado+Roble y Pescado+Uva que en el control, aunque las diferencias fueron muy pequeñas (-3%; $P<0,10$).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inclusión de aceite de pescado o taninos en la dieta no parece perjudicar de forma notable la fermentación ruminal, lo cual coincide con otros estudios in vitro e in vivo, en los que se ha mostrado que

cantidades similares de lípidos de origen marino (Toral et al., 2009, 2010c; Shingfield et al., 2010) o de extractos de taninos (Benhissi et al., 2013a; Carreño et al., 2015) no afectan negativamente a la función ruminal en las ovejas o en las vacas.

VI. CONCLUSIONES

La suplementación de la dieta con un 1% MS de aceite de pescado inhibe el último paso de la biohidrogenación ruminal in vitro, disminuyendo la acumulación de 18:0 e incrementando la de isómeros *trans* 18:1. Además, a juzgar por los aumentos de la concentración de *trans*-11 *trans*-15 18:2, también podría inhibir etapas previas. Por el contrario, en las condiciones de este trabajo, la administración de un 2% MS de extractos de taninos de roble o uva no parece modificar el metabolismo ruminal de los ácidos grasos. Su uso combinado con el aceite de pescado tampoco comporta mejoras más allá de las observadas con el suplemento de origen marino.

Por lo tanto, aunque la utilización conjunta de ambos compuestos (es decir, aceite de pescado y extractos de taninos) no perjudicaría la fermentación ruminal in vitro, los resultados del perfil lipídico no permiten aconsejar la aplicación práctica de esta estrategia nutricional cuando el objetivo es modular el proceso de biohidrogenación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AbuGhazaleh, A.A., Jenkins, T.C. 2004. Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87:1047-1050.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 75:1-12.
- AOCS. 2008. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 5th ed. (2nd printing). AOCS, Urbana, IL, USA.
- Barahona, R., Lascano, C.E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P., Theodorou, M.K. 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:1256-1266.
- Benchaar, C., Chouinard, P.Y. 2009. Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92:3392-3396.
- Benhissi, H., Frutos, P., Toral, P.G., Belenguer, A., Hervás, G. 2013a. Use of tannins to modify ruminal biohydrogenation in sheep. 1) Effects on in vitro rumen fermentation. *Options Méditerranéennes A*, 107:17-21.
- Benhissi, H., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P. 2013b. Use of tannins to modify ruminal biohydrogenation in sheep. 2) Effects on in vitro fatty acid composition of rumen digesta. *Options Méditerranéennes A*, 107:23-27.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P.G., Looor, J.J., Frutos, P. 2013. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *Journal of Dairy Science*, 96:524-532.
- Boeckeaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., Fievez, V. 2008a. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91:4714-4727.
- Boeckeaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., Boon, N. 2008b. Accumulation of *trans* C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:6923-6930.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., Mele, M. 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an *in vitro* study. *Animal*, 5:1521-1530.
- Cabiddu, A., Molle, G., Decandia, M., Spada, S., Fiori, M., Piredda, G., Addis, M. 2009. Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep. Part 2: Effects on milk fatty acid profile. *Livestock Science*, 123:230-240.
- Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., 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*, 202:45-51.
- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F.J. 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 79:279-288.
- Castro-Carrera, T. 2014. Efecto de la adición de lípidos a la dieta de ovejas lecheras sobre los microorganismos implicados en el metabolismo ruminal de los ácidos grasos y la regulación nutricional de la lipogénesis mamaria. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- Castro-Carrera, T., Toral, P.G., Frutos, P., McEwan, N.R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S.E., Belenguer, A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *Journal of Dairy Science*, 97:1661-1669.

- Chow, T., Fievez, V., Moloney, A., Raes, K., Demeyer, D., De Smet, S. 2004. Effect of fish oil on in vitro rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Animal Feed Science and Technology*, 117:, 1-12.
- Doreau, M., Bauchart, D., Chilliard, Y. 2011. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. *Animal Production Science*, 51:19-29.
- Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J.M., Stefanov, I., Vlaeminck, B. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function - An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172:51-65.
- Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., Demeyer, D. 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Animal Feed Science and Technology*, 104:41-58.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2004. An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55:1125-1132.
- Frutos, P., Toral, P.G., Ramos-Morales, E., Shingfield, K.J., Belenguer, A., Hervás, G. 2014. Oral administration of cobalt acetate alters milk fatty acid composition, consistent with an inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase in lactating ewes. *Journal of Dairy Science*, 97:1036-1046.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: The Rumen Microbial Ecosystem, Hobson, P.N. and Stewart, C.S. (Eds.), pp. 382-426. Chapman and Hall, London, UK.
- Harvatine, K.J., Boisclair, Y.R., Bauman, D.E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3:40-54.
- Hervás, G. 2001. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas: efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mora, M.J., Fernández, B., Mantecón, A.R. 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124:107-118.
- Huws, S.A., Lee, M.R.F., Muetzel, S.M., Scott, T.W., Wallace, R.J., Scollan, N.D. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73:396-407.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, Versailles, France.
- ISO 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 5983-2:2009. Animal feeding stuffs— Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content—Part 2: Block digestion and steam distillation method. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 5984:2002. Animal feeding stuffs—Determination of crude ash. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 6496:1999. Animal feeding stuffs—Determination of moisture and other volatile matter content. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid-metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76:3851-3863.
- Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86:397-412.
- Kairenius, P., Ärölä, A., Leskinen, H., Toivonen, V., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Hurme, T., Griinari, J.M., Shingfield, K.J. 2015. Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk

- fatty acid composition in lactating cows fed grass silage based diets. *Journal of Dairy Science*, 98:5653-5672.
- Keady, T.W.J., Mayne, C.S. 1999. The effects of level of fish oil inclusion in the diet on rumen digestion and fermentation parameters in cattle offered grass silage based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 81:57-68.
- Khanbabaee, K., van Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18:641-649.
- Khiaosa-ard, R., Bryner, S.F., Scheeder, M.R.L., Wettstein, H.R., Leiber, F., Kreuzer, M., Soliva, C.R. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*, 92:177-188.
- Khiaosa-ard, R., Soliva, C.R., Kreuzer, M., Leiber, F. 2011. Influence of alpine forage either employed as donor cow's feed or as incubation substrate on in vitro ruminal fatty acid biohydrogenation. *Livestock Science*, 140:80-87.
- Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., Scollan, N.D. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and *trans*-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *Journal of Nutrition*, 138:889-896.
- Kitessa, S.M., Peake, D., Bencini, R., Williams, A.J. 2003. Fish oil metabolism in ruminants - III. Transfer of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from tuna oil into sheep's milk. *Animal Feed Science and Technology*, 108:1-14.
- Kucuk, O., Hess, B.W., Rule, D.C. 2004. Soybean oil supplementation of a high-concentrate diet does not affect site and extent of organic matter, starch, neutral detergent fiber, or nitrogen digestion, but influences both ruminal metabolism and intestinal flow of fatty acids in limit-fed lambs. *Journal of Animal Science*, 82:2985-2994.
- Lee, M.R.F., Shingfield, K.J., Tweed, J.K.S., Toivonen, V., Huws, S.A., Scollan, N.D. 2008. Effect of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids in steers fed grass or red clover silages. *Animal*, 2:1859-1869.
- Lee, Y.-J., Jenkins, T.C. 2011. Identification of enriched conjugated linoleic acid isomers in cultures of ruminal microorganisms after dosing with 1-¹³C-linoleic acid. *Journal of Microbiology*, 49:622-627.
- Lock, A.L., Bauman, D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39:1197-1206.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4:1008-1023.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L., Wallace, R.J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91:303-314.
- Minieri, S., Buccioni, A., Rapaccini, S., Pezzati, A., Benvenuti, D., Serra, A., Mele, M. 2014. Effect of quebracho tannin extract on soybean and linseed oil biohydrogenation by solid associated bacteria: an *in vitro* study. *Italian Journal of Animal Science*, 13:604-608.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:2010-2037.
- Or-Rashid, M.M., Kramer, J.K.G., Wood, M.A., McBride, B.W. 2008. Supplemental algal meal alters the ruminal *trans*-18:1 fatty acid and conjugated linoleic acid composition in cattle. *Journal of Animal Science*, 86:187-196.
- Palmquist, D.L., Lock, A.L., Shingfield, K.J., Bauman, D.E. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, Taylor, S.L. (Ed.), pp. 179-217. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Reardon, J., Foreman, J.A., Searcy, R.L. 1966. New reactants for colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta*, 14:403-405.

- Sanz Sampelayo, M.R., Perez, L., Martin Alonso, J.J., Amigo, L., Boza, J. 2002. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance of lactating Granadina goats. Part II. Milk production and composition. *Small Ruminant Research*, 43:141-148.
- Shingfield, K.J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Äröla, A., Nurmela, K.V.V., Huhtanen, P., Griinari, J.M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77:165-179.
- Shingfield, K.J., Griinari, J.M. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:799-816.
- Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., Humphries, D.J., Scollan, N.D., Toivonen, V., Reynolds, C.K. 2010. Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers. *British Journal of Nutrition*, 104:56-66.
- Shingfield, K.J., Reynolds, C.K., Hervás, G., Griinari, J.M., Grandison, A.S., Beever, D.E. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89:714-732.
- Shingfield, K.J., Wallace, R.J. 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: Conjugated linoleic acids and conjugated vegetable oils, B. Sels, B. and A. Philippaerts A. (Eds.), pp. 1-65. The Royal Society of Chemistry, Oxford, UK.
- Simopoulos, A.P. 2009. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 99:1-16.
- Sukhija, P.S., Palmquist, D.L. 1988. Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 36:1202-1206.
- Taylor, K.A.C.C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56:49-58.
- Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P., Hervás, G. 2009. Effect of the supplementation of a high-concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. *Small Ruminant Research*, 81:119-125.
- Toral, P.G., Belenguer, A., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V., Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 95:794-806.
- Toral, P.G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A. 2010a. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 93:1604-1615.
- Toral, P.G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E., 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. *Journal of Dairy Science*, 96:431-439.
- Toral, P.G., 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.
- Toral, P.G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez M., de la Fuente, M.A. 2010b. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 93:1655-1667.
- Toral, P.G., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V., Frutos, P. 2010c. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93:4804-4817.
- Tsiplakou, E., Zervas, G. 2013. Changes in milk and plasma fatty acid profile in response to fish and soybean oil supplementation in dairy sheep. *Journal of Dairy Research*, 80:205-213.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991.: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
- Vasta, V., Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101:150-159.
- Vasta, V., Makkar, H.P.S., Mele, M., Priolo, A. 2009a. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 102:82–92.
- Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., Priolo, A. 2009b. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science*, 87:2674–2684.
- Vasta, V., Yañez-Ruiz, D.R., Mele, M., Serra, A., Luciano, G., Lanza, M., Biondi, L., Priolo, A. 2010. Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:2549–2555.
- Whitlock, L.A., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F., Baer, R.J., Ramaswamy, N., Kasperson, K.M. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *Journal of Dairy Science*, 85:234-243.
- Williams, B.A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Forage evaluation in ruminant nutrition, Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E. and Omed, H.M. (Eds.), pp. 189-213. CAB International, Wallingford, UK.