



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE INTERMEDIARIOS DE LA
BIOHIDROGENACIÓN DEL ENSILADO DE CANOLA (*Brassica*
***napus*) EN SUSTITUCIÓN DEL ENSILADO DE MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Presenta:

DANIEL LIMÓN HERNÁNDEZ



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE INTERMEDIARIOS DE LA
BIOHIDROGENACIÓN DEL ENSILADO DE CANOLA (*Brassica*
***napus*) EN SUSTITUCIÓN DEL ENSILADO DE MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Presenta:

DANIEL LIMÓN HERNÁNDEZ

ASESORES:

Dr. ERNESTO MORALES ALMARAZ

Ph.D. ADOLFO ARMANDO RAYAS AMOR

Dr. ANASTACIO GARCÍA MARTÍNEZ



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2018

DEDICATORIAS

A mis padres Raymundo y Margarita, por estar siempre pendiente y brindarme su apoyo incondicional en todo momento, gracias por sus consejos y por todo el amor recibido.

Al amor de mi vida ¡Te quiero mucho Gaby!

A mis profesores de las unidades de aprendizaje por contribuir con sus conocimientos para la realización de un mejor trabajo de investigación

A mis compañeros y amigos que coincidieron conmigo en estos dos años más de formación académica.

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para determinar la composición química, la digestibilidad *in vitro*, la producción de metano y el perfil de ácidos grasos (FA), así como la producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación de los FA poliinsaturados del ensilado de canola. El primer experimento evaluó la adición de distintos niveles de melaza al forraje de canola [0% (CS-0), 1% (CS-1), 2% (CS-2), 3% (CS-3) y 4% (CS-4) de melaza]. Los parámetros de fermentación y la producción de metano *in vitro* no se vieron afectados ($P>0.05$) por los tratamientos, la digestibilidad *in vitro* disminuyó significativamente ($P<0.05$) a medida que aumentó el nivel de melaza. El CS-4 mejoró el contenido de MS en un 9% y mostró un alto contenido de ácido linolenico, la producción de metano *in vitro* fue un 32% y un 7% menor que CS-2 y CS-0, respectivamente, 24 horas posteriores a la incubación. El segundo experimento evaluó la asociación (% base seca) de ensilado de maíz (MS) con ensilado de canola (CS) [Tratamientos: 100:00= 100%EM:0%EC; 80:20= 80%EM:20%EC; 60:40= 60%EM:40%EC; 40:60= 40%EM:60%EC; 20:80= 20%EM:80%EC]. Al incluir CS en sustitución de MS, aumentó el nivel de proteína, hubo una disminución de la materia orgánica y fibra detergente neutro, disminuyó de manera lineal la digestibilidad de la fibra, siendo 13% menor el tratamiento 20:80 con respecto al tratamiento 100:00. La producción de gas, las fracciones de los alimentos y el NH_3 no se vieron afectados ($P>0.05$) por los tratamientos. El ácido vaccénico fue contrastantemente mayor ($P<0.05$) en los tratamientos 80:20 y 20:80, lo cual no permite elucidar el papel del ensilado de canola sobre la producción de este intermediario de la hidrogenación de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos linoleico y linolenico, de hecho sin agregar CS se produjo la misma cantidad de ácido vaccénico que al incluir 60% de CS. Los valores más altos ($P<0.05$) de ácido linoleico conjugado (CLA) se encontraron en el tratamiento 80:20, y al incrementar el ensilado de canola en el sustrato se observó una disminución de CLA. Un patrón similar se observó en la producción de ácido linoleico, siendo el aporte más alto ($P<0.05$) por el tratamiento 80:20. En conclusión, el forraje de canola puede ser ensilado para utilizarse en la alimentación de rumiantes presentando alta digestibilidad y aporte de nutrientes, y una fuente importante de ácido linolenico. El uso de melaza (4%) como aditivo, mejora el porcentaje de materia seca y de fibra detergente neutro y disminuye el pH, el cual es indicativo de una adecuada fermentación. Mezclar CS con MS en proporciones del 20 al 80% no afecta la producción de gas y digestibilidad *in vitro* de la MS; el incremento máximo de inclusión de EC no aumenta la producción *in vitro* de ácido vaccénico, un AG importante para la síntesis *de novo* de CLA.

SUMMARY

Two experiments were carried out to determine the chemical composition, *in vitro* digestibility, methane production and fatty acid profile (FA), as well as the intermediaries' of biohidrogenación of FA polyunsaturated *in vitro* production of the canola silage. The first experiment evaluated the addition to the forage of canola of different levels of molasses [0 % (CS-0), 1 % (CS-1), 2 % (CS-2), 3 % (CS-3) and 4 % (CS-4) of molasses]. Fermentation parameters and methane *in vitro* production were not affected ($P>0.05$) for the treatments, the *in vitro* digestibility decreased significantly ($P<0.05$) as it increased the level of molasses. The CS-4 improved the MS content by 9% and showed a high content of linolenic acid. Methane production *in vitro* was 32% and 7% lower than CS-2 and CS-0, respectively, 24 hours after incubation.

The second experiment evaluated the association of silage maize (MS) with canola silage (CS) [% dry matter, %MS:%CS. Treatments: 100:00; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80].

The inclusion of CS increased protein content, there was a decrease of MO and FDN; a decreased the *in vitro* digestibility fiber in 20:80 treatment 13% less than 100:00 was observed. Gas *in vitro* production and the NH₃ were not affected ($P>0.05$). Vaccenic acid was contrastingly higher ($P<0.05$) in the 80:20 and 20:80 treatments, which does not allow to elucidate the role of the canola silage on the production of this intermediate of the hydrogenation of polyunsaturated fatty acids, linoleic acids and linolenic. In fact, without adding CS the same amount of vaccenic acid was produced as by including 60% CS. The highest values ($P<0.05$) of CLA were found in the 80:20 treatment, and by increasing canola silage in the substrate a decrease in CLA was observed. A similar pattern was observed in the production of linoleic acid, being the largest contribution by the 80:20 treatment. In conclusion, canola forage can be ensiling to be in use in the supply of ruminants presenting high digestibility and contribution of nutrients, and an important source of acid linolenico. Use of molasses (4 %) as additive, improves of dry matter and neutre detergent fiber content and diminishes the pH, which is indicative of a suitable fermentation. To include from 20 to 80 % CS mixed in proportions with MS not affected the gas production and *in vitro* digestibility, however, the *in vitro* production of vaccenic acid not increase, and this FA is important for the *novo* synthesis of CLA.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante mi formación como Maestro en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

A la Universidad Autónoma del Estado de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser el espacio que me permitió continuar con mi formación, además de permitirme el acceso a los diferentes espacios para la realización de mi trabajo experimental.

Al proyecto de investigación UAM-PTC-490, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A mis asesores Dr. Ernesto Morales Almaraz, Dr. Adolfo Armando Rayas Amor y el Dr. Anastacio García Martínez por sus atinados consejos y aportes a este trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 El cultivo de la canola para la alimentación animal	3
2.2. Conservación de forrajes	4
2.2.1. Henilaje	4
2.2.2. Ensilaje	4
2.3. Fases en el proceso de ensilaje	5
2.4. Uso de aditivos en el proceso de ensilaje	7
2.4.1. Melaza como aditivo en el ensilaje	8
2.5. Características nutricionales de los ensilados	9
2.6. Características de fermentación de los ensilados.....	10
2.7. Características de fermentación ruminal.....	12
2.7.1. Los microorganismos ruminales.....	13
2.7.1.1. Bacterias.....	14
2.7.1.2. Protozoarios	14
2.7.1.3. Hongos	15
2.7.2. Impacto ambiental de la digestión de los rumiantes.....	15
2.7.2.1. Emisiones de metano	15
2.8. Digestibilidad de los alimentos.....	17
2.8.1. Técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	17
2.8.1.1. Fraccionamiento de los carbohidratos del alimento incubado.....	18
2.8.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles	21
2.9. Importancia de los ácidos grasos en los productos de rumiantes	21
2.9.1. Metabolismo de los lípidos en rumen.....	24
2.9.1.1. Lipólisis	24

2.9.1.2. Biohidrogenación.....	25
2.9.2. Ácido linoleico conjugado (CLA).....	26
2.10. La alimentación para modificar el contenido de ácidos grasos en los productos de rumiantes	27
2.10.1. Pastoreo	28
2.10.2. Uso de aceites y semillas de oleaginosas.....	29
2.10.3. Uso de ensilados	31
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVOS.....	35
VI. MATERIALES Y METODOS.....	36
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1. Artículo de investigación enviado a la revista: Tropical Animal Health and Production.....	41
7.2. Digestibilidad, parámetros de fermentación ruminal, metano y producción <i>in vitro</i> de intermediarios de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados del ensilado de canola (<i>Brassica napus</i>) en sustitución del ensilado de maíz.....	57
VIII. CONCLUSIÓN	68
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
X. ANEXOS.....	82
10.1 Resumen enviado a la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Noviembre 2017.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Digestión y absorción de carbohidratos en rumiantes.....	20
Figura 2. Lipólisis y biohidrogenación (adaptado de Buccioni <i>et al.</i> , 2012).....	25
Figura 3. Formación de los isómeros más importantes del CLA en la leche.....	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del forraje de canola antes y después de ser ensilado..	4
Cuadro 2. Características organolépticas de los ensilados (Filippi, 2011).....	11
Cuadro 3. Composición química (g/kg MS), digestibilidad <i>in vitro</i> (g/kg MS) y perfil de ácidos grasos (g/100g AG) de mezclas de ensilado de canola con ensilado de maíz. ...	58
Cuadro 4. Parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> y nitrógeno amoniacal de mezclas de ensilado de canola con ensilado de maíz.....	59
Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos (g/100g AG) en mezclas de forraje con distinta proporción de ensilado de maíz y ensilado de canola en distintos tiempos de incubación <i>in vitro</i>	60
Cuadro 6. Contenido <i>in vitro</i> de ácidos grasos en raciones con distinta proporción de ensilado de maíz y ensilado de canola.....	64
Cuadro 7. Contenido de ácidos grasos (g/100g AG) en mezclas de forraje de ensilado de maíz y ensilado de canola en distintos tiempos incubaciones <i>in vitro</i>	66

I. INTRODUCCIÓN

Un cultivo alternativo en la temporada de invierno con potencial forrajero es la canola (*Brassica napus*), comúnmente conocida como colza o nabo aceitero. En 1978, la industria aceitera canadiense adoptó el nombre “canola” (Canadian Oil Low Acid) para identificar las plantas de estas especies, cuyo aceite contiene menos del 2% de ácido erúxico, y la pasta, menos de 30 micromoles de glucosinolatos por gramo (Canola Council); esta planta presenta producciones y un aporte nutricional similar o superior a las gramíneas de grano pequeño (Cruz *et al.*, 2012), es de rápido crecimiento, se adapta a condiciones frías y hace un uso eficiente del agua (Reta *et al.*, 2015).

Las Brassicas presentan alta digestibilidad de la materia seca (81 a 89 %) y energía metabolizable (2.8 a 3.3 Mcal EM / kg MS), estos valores suelen ser más altos que la mayoría de los pastos o legumbres de acuerdo a (Barry, 2013).

Sin embargo, las plantas del género *Brassica* presentan una elevada concentración de azufre en comparación con otras plantas forrajeras, debido principalmente al aminoácido libre S-metil-cisteína sulfóxido (SMCO) y glucosinolatos, además de presentar altas concentraciones de sulfato inorgánico (Barry, 2013); se ha comprobado que los glucosinolatos tienen propiedades anti-nutricionales, reduciendo el consumo de alimento y la digestibilidad de aminoácidos en los animales (Bell, 1993); Tripathi y Mishra, 2007); sin embargo estudios han demostrado que el proceso de ensilaje es un método que contribuye a disminuir estos efectos anti nutricionales que posee la canola (Fales *et al.*, 1987; Woolford, *et al.*, 1984), además permite conservar el forraje sin afectar sus características nutricionales ni palatabilidad, para que sea utilizado en los períodos del año en donde la falta de agua limita la producción de forrajes.

En México, las Brassicas son consumidas por los campesinos y sus familias de manera natural, de ellas se consumen partes de la planta de manera tradicional (hojas tiernas, tallos tiernos y flores), (Bye y Linares 2000); en otros países el forraje de Brassicas se utiliza en regiones frías para la producción ganadera (Claridge, 1972; Macfarlane Smith *et al.*, 1984).

Si bien, es sabido que la siembra de canola para la alimentación animal aun es limitada, es un cultivo alternativo en la temporada de invierno con gran potencial forrajero, incluso se ha comparado con alfalfa reportando mayor digestibilidad (Hall y Jung, 2008) y niveles similares de nutrientes (Dansby *et al.*, 2011), además de que aportan altas cantidades de ácidos grasos polinsaturados (Williams *et al.*, 2016), los cuales pueden contribuir en mejora la calidad del producto final como lo es leche y carne.

Mejorar la calidad lipídica de la leche y carne de rumiantes ha tenido un creciente interés debido a la presencia del ácido linoleico conjugado (CLA, C18:2 *cis*-9, *trans*-11), un ácido graso con beneficios en la salud humana, ya que tiene efectos anticancerígenos (Palombo *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003), mejora la inmunidad (Harbige, 1998), reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Alexander, 1998) y se ha observado alivio anti-inflamatorio en artritis reumatoide (Belch and Muir, 1998). El CLA es generado en el rumen como producto intermediario de la biohidrogenación (BH) del ácido linoleico a ácido esteárico (Bauman *et al.*, 1999), esta fracción de CLA sintetizada en el rumen puede ser absorbida y presentarse en la grasa de la carne o leche (Bauman *et al.*, 2000). Además, el CLA se puede obtener a partir de síntesis endógena en la glándula mamaria, por la deshidrogenación entre los carbonos 9 y 10 del ácido *trans*-vaccénico (ATV, C18:1 *trans*-11), el cual es un intermediario de la BH del ácido alfa-linolénico (ALn, C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) por acción de la esteroil CoA desaturasa (ECD) (Grinari y Bauman, 1999).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de la canola para la alimentación animal

En el norte de México, Cruz *et al.* (2012) reportaron mejor comportamiento del forraje de canola respecto a la eficiencia del agua en comparación con el triticale, avena y ballico anual en cuanto a la producción de materia seca (1.91 kg MS/m^3), proteína cruda (0.47 kg PC/m^3) menor proporción de FDN (39,01%) y mayor contenido de ENL (2.83 Mcal/m^3), siendo 2.17 veces más alto que el ballico (1.3 Mcal/m^3), 2.83 mayor que la avena (1.49 Mcal/m^3) y 1.79 más alto que el triticale (1.58 Mcal/m^3), esto se explica por la precocidad y menor tasa de evo-transpiración de la canola (Al-Ghobari, 2000; Inzunza *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo reportado por Cruz *et al.* (2012) la canola presentó rendimientos de MS de 10.39 ton/ha los cuales fueron inferiores al triticale (13.81 ton/ha) similares a la avena (10.30 y 9.98 ton/ ha respectivamente) y valores superiores al ballico (8.21 ton/ha); la canola sobresalió en los porcentajes de FDN y ENL (39.01 % y 1.44 Mcal kg MS respectivamente) y se situó en el segundo sitio por debajo del ballico en la cantidad de proteína cruda (27.24 vs 24.03 % PC).

En otros países el forraje de Brassicas se utiliza en regiones frías para la producción ganadera (Claridge, 1972; Macfarlane Smith *et al.*, 1984).

Kincaid *et al.* (2012) reportan que la producción de leche y la composición química no fueron afectadas cuando incluyeron ensilado de canola con asociación de chícharo comestible en 9 y 15 % de la dieta en sustitución de alfalfa y ensilado de maíz, por lo tanto concluyen que es una alternativa de cultivo especialmente en tierras donde no se dispone de suficiente agua. Estos autores determinaron el aporte nutricional del forraje verde y ensilado de canola (Cuadro1).

Williams *et al.* (2016), realizaron un estudio con vacas Holstein en producción, donde compararon alfalfa, achicoria en etapa reproductiva y forraje de Brassica; la mayor producción leche fue para el tratamiento con forraje de Brassica (27.5 kg/d), en segundo lugar se ubicó la alfalfa (23.9 kg/d) y finalmente el tratamiento donde se incluyó achicoria con una producción de 20.4 kilogramos de leche al día.

Cuadro 1. Composición química del forraje de canola antes y después de ser ensilado

<i>Componente %</i>	<i>Forraje de canola</i>	<i>Ensilado de canola</i>
<i>Materia seca</i>	30.7	30.6
<i>Proteína cruda</i>	12.72	13.28
<i>Fibra detergente neutro</i>	35.29	29.82
<i>Fibra detergente ácido</i>	24.53	24.12
<i>Lignina</i>	4.55	4.89
<i>DIVMS</i>	72.68	75.06
<i>Almidón</i>	10.12	8.08
<i>Grasa</i>	1.99	1.98
<i>Cenizas</i>	14.91	17.5
<i>Calcio</i>	1.34	1.34
<i>Fosforo</i>	0.26	0.28

Adaptado de Kincaid *et al.* (2012)

2.2. Conservación de forrajes

2.2.1. Henilaje

Una manera común de conservar los forrajes es por deshidratación, la cual consiste en dejar que estos pierdan la mayor cantidad de agua posible para evitar contaminación por hongos principalmente; sin embargo, con este método podemos perder también cantidades abundantes de nutrientes, además de disminuir la palatabilidad y digestibilidad de los forrajes.

2.2.2. Ensilaje

Es un método de conservación de forrajes frescos el cual se basa en la inmediata fermentación en condiciones anaeróbicas. Este método de conservación tiene como objetivo conservar las características nutricionales de los forrajes a ensilar. La fermentación ocurre por medio de bacterias propias del material, estas fermentan los carbohidratos solubles a ácido láctico y en menor grado ácido acético (Hendersom, 1993), lo cual disminuye el pH y como producto final obtenemos un alimento ácido, el cual inhibe el desarrollo de microorganismos que inducen a la putrefacción (Elferink *et al.*, 1999). Este proceso sirve para almacenar grandes cantidades de alimento en tiempos

de abundante forraje y suministrarlo en periodos de estiaje, conservando calidad y palatabilidad a bajo costo, permitiendo aumentar el número de animales por hectárea, (Garces *et al.*, 2004), de igual manera contribuye a disminuir la cantidad de concentrados reduciendo costos de producción (Prospero *et al.*, 2017).

En las ganaderías modernas los forrajes son cosechados en la fase donde se conjunta el mayor rendimiento y más alto valor nutritivo y se ensilan para disponer de un suministro continuo de alimento durante el año.

El ensilaje es un proceso que se emplea principalmente en países desarrollados; se estima que 200 millones de toneladas de materia seca son ensilados en el mundo anualmente, a un costo de la producción entre US \$100-150 por tonelada. Este costo comprende: el cultivo de la tierra (50%), segado y polietileno (30%), silo (13%) y aditivos (7%), aproximadamente (Garcés *et al.*, 2004).

2.3. Fases en el proceso de ensilaje

El éxito del proceso fermentativo que ocurre en los ensilajes depende entre otras cosas, de la suficiente, cantidad de bacterias ácido lácticas y niveles adecuados de carbohidratos altamente solubles en los cultivos cosechados, obteniéndose altas producciones de ácido láctico. Como resultado, el pH se mantiene bajo y los ensilajes son preservados (Jaster, 1995). Para que suceda el proceso de fermentación, es necesario cubrir el forraje y extraer la mayor cantidad de aire posible, una vez realizado esto el proceso de ensilaje pasara por cuatro etapas (Weinberg y Muck, 1996; Merry *et al.*, 1997).

A) Fase aeróbica

Es la primera fase y en ella se consumirá todo el oxígeno que quedó durante el proceso de compactación, esta etapa dura pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de la planta, microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y enterobacterias. Además hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH del forraje fresco se mantenga en el rango normal (6.0-6.5) (Elferink, *et al.*, 1999; Tobia y Vargas, 2000).

B) Fase de fermentación

Esta fase comienza cuando el ambiente se vuelve anaerobio; el tiempo requerido para este proceso comprende de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, las bacterias productoras de ácido láctico proliferarán y se convertirán en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3.8 a 5.0 (Elferink, *et al.*, 1999; Tobia y Vargas, 2000).

C) Fase estable

Mientras se mantenga el ambiente sin presencia de oxígeno no ocurrirán demasiados cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia, algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas, carbohidrasas, y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo (Elferink *et al.*, 1999).

Pueden aparecer algunas bacterias indeseables en esta fase, se trata de bacterias acidófilas, ácido tolerantes y aerobias. Como ejemplo tenemos a *Acetobacter spp.* la cual es perjudicial en el ensilaje porque puede iniciar una deterioración aeróbica, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo CO₂ y agua. El género *Clostridium* es anaerobio, forma endosporas y puede fermentar carbohidratos y proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje (Garces *et al.*, 2004).

D) Fase de deterioro aerobio

Esta fase dará comienzo con la apertura del silo y la exposición del ensilado al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el material ensilado, sin embargo puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo a causa de fauna nociva principalmente.

El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético; esto provoca un aumento en los niveles de pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se

presenta un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos (McDonald *et al.*, 1991).

La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos facultativos como mohos y enterobacterias; de acuerdo a Honig y Woolford (1980) las pérdidas por deterioro en esta etapa pueden oscilar entre 1.5 y 4.5 % de MS.

Los mohos son organismos aerobios, cuando proliferan se observa la aparición de filamentos de diversos colores, de acuerdo a las especies presentes. Se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive trazas. En un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante la fase del deterioro aerobio todo el ensilaje puede ser invadido por mohos (Garces *et al.*, 2004).

El deterioro aeróbico ocurre en la gran mayoría de los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire. Sin embargo, la tasa de deterioro depende de la concentración y de la actividad de los organismos que causan este deterioro en el ensilaje.

2.4. Uso de aditivos en el proceso de ensilaje

Dependiendo de las características de cada forraje a ensilar se pueden utilizar distintos tipos de aditivos que ayudan a obtener una mejor fermentación del material ensilado.

Tipos de aditivos para ensilaje de acuerdo a McDonald *et al.* (1981):

- Estimulantes
- Inhibidores.
- Nutrientes
- Estimulantes de la fermentación

A) Estimulantes: Son azúcares o productos ricos en carbohidratos como melaza, pulpa de cítricos, maíz triturado, residuos de panadería (Mejía *et al.*, 2013) Por lo general este tipo de aditivos aportan energía y ayudan al crecimiento de las bacterias ácido lácticas y como consecuencia se obtienen ensilajes lácticos.

Son ampliamente recomendados para forrajes que contienen pocos azúcares solubles para fermentar o un bajo contenido de materia seca; por lo tanto, para que

exista una buena fermentación es necesario aumentar el contenido de azúcares (Garces *et al.*, 2004) con algún producto rico en carbohidratos solubles.

B) Inhibidores: Restringen el crecimiento de los microorganismos dependiendo del nivel agregado. Ej. Ácido fórmico y el formaldehído.

Inhibidores de deterioro aeróbico: Este tipo de aditivos ayudan a controlar el deterioro causado por aire cuando el ensilaje se abre y queda expuesto. Ej. Ácido propiónico.

C) Nutrientes: Se agregan al momento de ensilarlos forraje con el fin de incrementar el valor nutritivo de los ensilados. Ej. Urea.

D) Estimulantes de la fermentación: Se agregan con el propósito de estimular y activar la fermentación láctica, en este rubro se incluyen inoculantes bacterianos y enzimas (Demarquilly, 1985; Tobia y Vargas, 2000).

- **Inoculantes bacterianos:** Se trata de productos comerciales que contienen una gran concentración de bacterias ácido lácticas que colonizan el medio e incrementan la población natural en los cultivos, propiciando que ocurra una rápida y eficiente fermentación dentro del silo (Kung Jr. y Muck 1997). Además ayudan como estimulantes de la fermentación e inhibidores del deterioro aeróbico (Stefanie *et al.*, 1999, promueven una rápida y eficiente fermentación de los materiales ensilados, lo cual incrementa la calidad y cantidad ya que aumentan la materia seca del producto ensilado.
- **Enzimas:** Su principal función es romper la celulosa y hemicelulosa que forman las paredes celulares de las plantas. Este proceso se denomina enzimolisis y envuelve la partición de los carbohidratos estructurales en sus monómeros (glucosa en caso de celulosa, y pentosas y hexosas en el caso de hemicelulosas). Entonces estos azúcares quedan disponibles y son utilizados por las bacterias ácido lácticas presentes en el forraje (McDonald *et al.*, 1981).

2.4.1. Melaza como aditivo en el ensilaje

La melaza es un subproducto de la industria azucarera ampliamente utilizado en la alimentación animal, es común agregarla a los ensilados en diferentes porcentajes para proporcionar carbohidratos fácilmente fermentables para que sean utilizados por las bacterias presentes en los forrajes que se van a ensilar. Su aplicación directa es

complicada ya que posee una alta viscosidad, por lo que es recomendable diluirla en agua tibia para minimizar las pérdidas por escurrimiento.

Su aplicación en el ensilado sirve como una fuente de energía para los microorganismos productores de ácido láctico, además que puede incrementar el contenido de materia seca del ensilado (Baytok y Aksu, 2005).

Principalmente las leguminosas se consideran inapropiadas para el ensilaje debido a tres factores principales: son altamente tamponantes, tienen bajo contenido de carbohidratos hidrosolubles y de MS, debido a altos niveles de proteína, por ello, es necesario añadirle una fuente de carbohidratos solubles, con la finalidad que las bacterias ácido lácticas aceleren el proceso de fermentación, incrementándose, así la producción de ácidos grasos volátiles (principalmente ácido láctico y, en menor cantidad, ácido acético); lo que le confiere un olor agradable al producto ensilado. (McDonald *et al.*, 1991; Bolsen y Brent, 2007).

2.5. Características nutricionales de los ensilados

Materia seca

Es importante, ya que controladora de la calidad del proceso fermentativo. Cuando la materia seca del forraje a ensilar es mayor a 25%, se reduce el nivel de efluentes y las pérdidas de carbohidratos por esta vía; además disminuye las pérdidas por respiración, permite un predominio de las bacterias ácido-lácticas y un pH adecuado. El valor adecuado para obtener un ensilado de calidad va del 30 y 35% (Vallejo, 1995).

Cenizas

Se considera cenizas a la materia inorgánica o contenido mineral que forma parte de los alimentos. Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica (AOAC, 1990). En la mayoría de los forrajes el porcentaje de cenizas es menor al 10%. Cuando se supera este valor, se sospecha de contaminación por tierra durante la cosecha.

Proteína cruda

El 75 y 90% del nitrógeno total del forraje fresco se encuentra como proteína, mientras que el resto está en forma no proteica, sin embargo, durante la fermentación esta proporción cambia considerablemente. En un ensilaje mal conservado, 75% o más del

nitrógeno puede solubilizarse, convirtiéndose en amoníaco, además de la pérdida que representa en el valor nutritivo de la proteína, estos cambios impiden la caída del pH, dificultando la estabilidad del ensilaje.

Fibra

La fibra se encuentra formada por 3 fracciones principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, en diferentes cantidades que dependen del tipo de forraje y la edad de madurez a la que es cosechado. La fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) se utilizan como indicadores de calidad, ya que tiene estrecha correlación con la digestibilidad de la muestra, su valor energético y el consumo voluntario del alimento. El porcentaje de FDN se incrementa con el estado de madurez de los forrajes. En general, entre mayor contenido celular y menor porcentaje de FDN, la muestra tiene mayor digestibilidad.

2.6. Características de fermentación de los ensilados

A) Indicadores organolépticos.

Es una evaluación que se basa en la apreciación de la calidad de un ensilaje a través de los sentidos (Cuadro 2). Los parámetros a considerar son: olor, color, textura y grado de humedad. Este método es subjetivo y está sujeto a la experiencia del evaluador (Tobia y Vargas, 2000).

B) Nitrógeno Amoniacal.

Es un indicador de la calidad de preservación del forraje. A mayor cantidad de NH_3 menor concentración de carbohidratos solubles de la planta original. Por lo tanto, las leguminosas forrajeras y las gramíneas en estados tempranos de madurez y con bajos contenidos de azúcares, no obtienen un pH bajo para evitar el desarrollo de clostridios responsables de fermentaciones secundarias que transforman el ácido láctico en butírico y degradan proteínas y aminoácidos ocasionado un aumento en el nivel de N-NH_3 . El valor óptimo de nitrógeno amoniacal del nitrógeno total que es aceptable para un ensilaje agradable y de buena calidad es menor a 7 % (Ojeda *et al.*, 1991; Vallejo, 1995).

C) Ácidos Orgánicos

- **Ácido Láctico**

Es el resultado del metabolismo de las bacterias más eficientes y adaptadas entre todas las presentes en los ensilajes, esto le permite cumplir una acción bactericida, conservando mejor el ensilaje (Ojeda, *et al.*, 1991).

Cuadro 2. Características organolépticas de los ensilados (Filippi, 2011)

Indicador	Calidad			
	Excelente	Buena	Regular	Mala
Color	Verde oliva o café claro	Verde amarillento Los tallos con tonalidad más tenue que las hojas	Verde oscuro Tallos y hojas de la misma tonalidad	Casi negro o negro
Olor	Agradable, a tabaco ánfora o fruta madura	Agradable, ligero olor a vinagre No deja residuos en la mano al ser tocado	Acido, con fuerte olor a vinagre Deja en las manos un permanente olor a manteca rancia, característico de ácido butírico	Desagradable, con olor putrefacto a humedad Deja un olor a manteca rancia en las manos Alto olor a amoníaco que perdura por mucho tiempo en las manos
Textura	Contornos definidos Velloidades si las tenía el forraje original Hojas unidas a tallos Se observan todas las partes de la planta	Contornos definidos Presencia de velloidades si las tenía el forraje Las hojas permanecen unidas a los tallos No se observan todas las partes constituyentes de la planta	Las hojas se separan fácilmente de los tallos Los bordes del forraje aparecen mal definidos Las hojas tienden a ser transparentes Muy amarillos los tallos leñosos	No se aprecia diferencia entre hojas y tallos Se forma una masa amorfa y jabonosa al tacto
Humedad	No humedece la mano al ser comprimido Con una presión normal se mantiene suelto el ensilado	No humedece la mano al ser comprimido Con una presión normal se mantiene suelto el ensilado	Al ser comprimido gotean efluentes Tendencia a ser compactado y formar una masa	Destila líquido efluente Se compacta con facilidad y llega a tomar la forma deseada

- **Ácido Acético.**

Ácido cuya eficacia conservadora no es muy notable debido a su escasa capacidad acidificante; este ácido se produce a través de distintas vías: por la metabolización de aminoácidos por bacterias proteolíticas; metabolización de las hexosas por bacterias heterolacticas; metabolización de las pentosas y los ácidos orgánicos de la planta por bacterias heterolacticas y homolacticas y metabolización de las hexosas por las bacterias heterolacticas, enterobacterias y levaduras, principalmente *Acetobacter*. El valor aceptable de ácido acético para un ensilado es menor del 1.8% (Ojeda *et al.*, 1991; Vallejo 1995).

- **Ácidos Butírico, Isobutírico y Propiónico.**

Estos ácidos son producto del metabolismo de bacterias indeseables del género *Clostridium*, por esta razón, son uno de los mejores indicadores para determinar la calidad de fermentación de los ensilajes. En los ensilados con una fermentación idónea, estos ácidos no deben estar presentes, ya que son indicativos de proliferación de bacterias clostrídicas. La cantidad de estos ácidos en un ensilado de calidad debe ser menor a 0.1% (Ojeda *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 1968; Vallejo, 1995).

D) Indicador de Acidez (pH).

El pH es un indicador de gran relevancia en un forraje ensilado, debido a que es una de las transformaciones más radicales que ocurre en el forraje durante el proceso de fermentación. Se considera un parámetro rápido e indicativo del tipo de fermentación que se llevó a cabo y nos indica, por tanto, si disponemos de un alimento adecuado. De acuerdo a Vallejo (1995) el valor óptimo de pH en ensilados con contenidos de 40% de MS es $\leq 4,87$, se considera que cuando un ensilaje alcanza valores inferiores a 4.2 se ha logrado su estabilidad fermentativa (Muck, 1988; Vallejo, 1995).

2.7. Características de fermentación ruminal

La digestión en los rumiantes es el resultado de una serie de fases que se llevan a cabo en diversos compartimentos del tracto gastrointestinal. Estos procesos constan de: una fermentación de los componentes de la dieta por microorganismos en el retículo - rumen, una hidrólisis ácida y degradación enzimática en el abomaso e intestino, y una siguiente fermentación en el ciego y en el intestino grueso (Merchen *et al.*, 1997).

El principal sitio para la digestión en un rumiante es el rumen, donde el alimento es retenido por periodos de tiempo sustanciales (24-72 horas) y sometido a una extensa fermentación microbiana bajo condiciones anaeróbicas. De tal manera que, el proceso alimenticio de los rumiantes es llevado a cabo por la simbiosis entre los microorganismos ruminales y el huésped (McDonald, 2006). Para que se lleve a cabo este proceso de fermentación el retículo- rumen debe suministrar un ambiente idóneo a la microflora ruminal; el pH debe de oscilar entre 6.2 y 7 (Kamra, 2005), la temperatura se debe mantener entre 38 y 42°C, debe haber suficiente humedad debido a la abundancia de agua disponible procedente del agua de bebida, salivación y alimentación y debe imperar un ambiente sin oxígeno (anaerobio) como resultado del ágil consumo de oxígeno que ingresa al rumen (McDonald, 2006).

2.7.1. Los microorganismos ruminales

Los rumiantes son considerados como la especie de mayor desarrollo en el sistema digestivo, las adaptaciones anatómicas dieron como resultado la compartimentación del tracto digestivo y el desarrollo de una fermentación pre-gástrica, a través de una simbiosis entre el rumiante y el ecosistema microbiano que habita en él. El rumen es una adaptación ampliamente especializada del tracto digestivo de los rumiantes. Los microorganismos ruminales llevan a cabo un complejo proceso de fermentación esencial para la digestión del alimento del hospedero (Fonty *et al.*, 1991).

Podemos encontrar en el rumen una de las mayores concentraciones y diversas poblaciones de microorganismos notables, mediante la cual sostiene una convivencia simbiótica con el hospedero. En su mayoría están compuestas por microorganismos anaerobios estrictos, sin embargo existe una reducida población de bacterias anaerobias facultativas, las cuales soportan diminutas densidades de oxígeno que pueden emplear en su metabolismo. La población microbiana del rumen está formada por bacterias, hongos y protozoos. Las clases y equilibrio de microorganismos se alteran de acuerdo con el tipo de pienso (Doré y Gouet 1991). Las bacterias son las encargadas fundamentalmente en la fermentación de los carbohidratos estructurales y la proteína de las plantas (Stewart, 1991). Los protozoos ciliados son fundamentales en el aprovechamiento de los carbohidratos no estructurales, los cuales participan en la

desintegración físico del alimento y es el principal regulador del pH ruminal (Prins, 1991).

La población microbiana ruminal está compuesta principalmente por tres grandes grupos: bacterias, protozoarios y hongos.

2.7.1.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares (procariotas) sin núcleo definido y pared celular formada por peptoglicanos, son los microorganismos más abundantes en el ecosistema ruminal, representan el 50 % de la masa total del rumen, dentro de las bacterias se encuentran una gran variedad de géneros y especies agrupadas de acuerdo con su actividad. La mayor parte son anaerobias estrictas, aunque en menor grado se encuentran bacterias anaerobias facultativas. Algunas de sus funciones son la degradación de la fibra, digestión de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y almidones), producción de aminoácidos, fermentación de azúcares solubles y producción de ácidos grasos volátiles (AGV'S) (Mojica, 1993).

El número de bacterias en el rumen varía entre 10^{10} y 10^{11} por gramo de líquido ruminal, esta cantidad representa entre 3 y 8 kg de bacterias en el rumen de un bovino adulto.

2.7.1.2. Protozoarios

Los protozoarios son microorganismos unicelulares (eucariotas), correspondientes al reino Protista, que tienen cilios como medio de locomoción; el tamaño de los protozoarios es (10 – 200 μm de ancho y 15 – 25 μm de largo) el cual es mucho mayor que los de las bacterias y representan el 40% del nitrógeno microbiano total, además solo colaboran con el 20% de las proteínas y alrededor del 50% de la biomasa. Son altamente sensibles a las alteraciones de las dietas. El flujo de protozoarios al abomaso es menor que el de las bacterias, ya que se conservan en las partículas de alimentación (Romero *et al.*, 2012).

Los protozoos son una parte importante del hábitat microbiano y poseen una función considerable en la fermentación. Su aprovechamiento para los rumiantes ha sido polemizado; diversas investigaciones han comprobado que los protozoos aumentan la

digestibilidad ruminal y el rendimiento de los animales, mientras tanto otros ensayos no han observado ninguna diferencia entre su presencia y ausencia. Ante esta contradicción, se ha asignado a los protozoos una función de estabilización de la fermentación, inspeccionado al nivel de nutrientes y asegurando una fermentación más uniforme durante los intervalos entre comidas, previniendo así considerables fluctuaciones de pH (Orskov, 1992).

2.7.1.3. Hongos

Los hongos poseen paredes celulares ensanchadas con quitina, son organismos eucariotas y heterótrofos. Los hongos en el rumen representan aproximadamente el 8 % de la biomasa microbiana ruminal y son estrictamente anaerobios, dentro de sus funciones se encuentra colaborar con la asimilación del alimento fibroso entre las primeras horas luego de ser consumido. Estos no son abundantes en el rumen, ya que su tasa de multiplicación muy baja (Rodríguez, 2005).

2.7.2. Impacto ambiental de la digestión de los rumiantes

La ganadería y la agricultura contribuyen ampliamente en las emanaciones antropogénicas de gases de efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) al medio ambiente. El aumento de estos gases ocasiona el calentamiento de la superficie terrestre y la pérdida de la capa de ozono de la atmósfera (Primavesi, 2004). El gas de efecto invernadero con mayor proporción y contribución al calentamiento global es el CO₂. Actualmente el CH₄ se encuentra en menor cantidad que el CO₂, aunque está aumentando vertiginosamente y se dice que es 21 a 30 veces más contaminante que el CO₂.

2.7.2.1. Emisiones de metano

Las emisiones de CH₄ por el ganado bovino, se calculan en 58 mil millones de toneladas al año, esta cifra equivale al 73% del total de emisiones (80 millones) correspondientes a las especies domésticas (Kurihara *et al.*, 1999; Johnson y Johnson, 1995). El ganado bovino es responsable de la producción del 15% de (CH₄) global, entre otros contribuyentes importantes de metano podemos citar a la combustión de biomasa (10%), pérdidas por combustión de hidrocarburos (14%), cultivos de arroz

(20%) y un (21%) de los pantanos naturales (McCaughey *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 2000).

Se considera que los bovinos comienzan a producir metanos A partir del desarrollo del retículo y el rumen un par de semanas después de su nacimiento (Johnson y Johnson, 1995). Los principales microorganismos que imperan en este proceso digestivo son microorganismos del dominio *Archaea* (Jarvis *et al.*, 2000; Liu y Whitman, 2008), los cuales se encuentran en concentraciones que oscilan entre 10^7 y 10^9 células por ml del líquido ruminal (Kamra, 2005). Los dos géneros más populares son *Methanobrevibacter* y *Methanosarcina* (Liu y Whitman, 2008; Moss *et al.*, 2000). Los microorganismos metanogénicos utilizan distintos sustratos tales como el acetato, grupos metilos, dihidrógeno y CO₂ (Kurihara *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 2000), productos finales de la fermentación de proteínas, almidones y compuestos de la pared celular de los alimentos por parte de microorganismos como protozoos, hongos y bacterias (McAllister *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 2000). La emisión de metano resultado de la fermentación ruminal, está correlacionada con las características físico-químicas de la dieta, como lo es la digestibilidad de la materia seca, y la cantidad de fibra detergente neutro), las cuales a su vez afectan el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación (Ulyatt *et al.*, 2012). Los rumiantes que producen mayor cantidad de metano son los que consumen forrajes de regular a baja calidad (alto contenido de lignina y bajos niveles de proteína y carbohidratos solubles).

Se ha encontrado que lo contrario ocurre al incluir leguminosas en la dieta (Boadi *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2012), por tener contenidos altos de proteína, bajos niveles de fibra y presencia de compuestos secundarios como los taninos los cuales inhiben la proliferación de bacterias metanogénicas (Boadi *et al.*, 2012; Tavendale *et al.*, 2005).

Es por ello que una de las maneras que tenemos para mitigar la producción de metano es por medio de las dietas, por ejemplo, países que tienen una mejor alimentación para el ganado reportan emisiones de 35 kg CH₄/ año, mientras que países en vías de desarrollo y con dietas menos eficientes, alcanzan emisiones de 55 kg CH₄/ año por animal (Kinsman *et al.*, 1995).

Williams *et al.*, 2016) reportaron menor producción de metano por kilogramo de materia seca consumida en vacas que ingirieron forraje de Brassicas (20.5 g/kg MS ingerida) vs vacas que consumieron achicoria (26.1 g/kg MS ingerida).

2.8. Digestibilidad de los alimentos

La digestibilidad se define como la capacidad de un alimento para ser asimilado por una determinada especie, este parámetro es trascendental en la prescripción de dietas (NRC, 2001). La digestibilidad de los alimentos depende de la organización de la pared celular, principalmente por el porcentaje de lignina que está presente (Jung y Allen, 1995). La digestibilidad se ve altera por factores relacionados con el alimento, los animales que lo consumen o por ambos. Para la asimilación de los alimentos en una misma especie animal es variable y dependen exclusivamente de la edad, estado de salud, raza, clase o magnitud de las labores a la que están sometidos (Shimada, 2009).

2.8.1. Técnica de producción de gas *in vitro*

Existen gran cantidad de técnicas para determinar las características nutricionales de los alimentos para rumiantes, las básicas son las que nos ayudan a conocer el análisis químico proximal de un alimento, sin embargo, es necesario e importante conocer las características de fermentación que poseen dichos alimentos. Estas características de fermentación pueden estudiarse por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, sin embargo, en los estudios *in vivo* los alimentos solo pueden ser evaluados en raciones completas, resultan análisis costosos y difíciles de estandarizar; por lo que a lo largo del tiempo se han desarrollado gran cantidad de metodologías *in situ* e *in vitro* para conocer estas características.

Una de las primeras técnicas para la estimación de la digestibilidad en rumiantes fue la propuesta por Tilley y Terry (1963), dicha propuesta marcó una gran pauta para el desarrollo de técnicas más exactas, ejemplo de ello es la determinación de digestibilidad *in sacco* de Ørskov y McDonald (1979) y técnicas de producción de gas *in vitro* (Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988), siendo esta última muy popular debido a su bajo costo y alta reproducibilidad. Esta técnica consiste en llevar a cabo la fermentación de un alimento en jeringas de vidrio, con el objetivo de poder medir el volumen de gas producido a las 24 horas de fermentación, de tal manera que al aumentar el volumen de

gas producido el embolo de la jeringa se irá desplazando; y en combinación con otros valores como lo es proteína cruda, porcentaje de cenizas, grasa cruda y fibra cruda se puede predecir la cantidad de energía metabolizable de un alimento.

En la década de los 90s en el Reino Unido fue desarrollado un método que utiliza un transductor de presión, el cual mide la presión generada por la fermentación de un alimento en frascos de vidrio. La presión y volumen de gas son tomados en momentos regulares, cada tres o cuatro horas durante el primer día y después en lapsos más largos hasta obtener el valor de fermentación a las 120 o 144 horas; la presión de gas generada en cada lectura es liberada, la presión acumulada representa la cinética del proceso de fermentación del alimento que se incubó (Theodorou *et al.*, 1994).

El principio de las técnicas de producción de gas *in vitro* es que la cantidad de gas producido por un alimento incubado *in vitro* en combinación de líquido ruminal y una solución nutritiva, es directamente proporcional con la digestibilidad, degradación y cantidad de energía del alimento (Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988; Krishnamoorthy *et al.*, 1995).

El gas producido es derivado de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce AGV, succinato, formato, lactato, etanol, CO₂, CH₄, y trazas de hidrógeno (H₂) (Posada y Noguera, 2005).

2.8.1.1. Fraccionamiento de los carbohidratos del alimento incubado

Los carbohidratos conforman del 50 al 80 % de la materia seca de forrajes y granos, la calidad nutritiva de estos carbohidratos depende de diverso factores, como lo es la cantidad de azúcares que contengan, de sus enlaces con lignina y diversos factores fisicoquímicos. La química nutricional de los carbohidratos describe la degradación de estos tanto en su forma estructural y no estructural, así como los factores que influyen en la disponibilidad al animal y la digestión microbiana (Van Soest, 1994).

Los carbohidratos solubles en agua representan la fracción que se digiere de manera inmediata al contacto con el agua o el contenido gastrointestinal. Aquí podemos citar a los monosacáridos, oligosacáridos y ciertos polisacáridos (Van Soest, 1994).

Los almidones son carbohidratos de almacenamiento para las plantas, entran en la clasificación de carbohidratos solubles ya que se gelatinizan y son parcialmente solubles en agua caliente (Van Soest, 1994).

Otro tipo de carbohidratos son los polisacáridos estructurales, estos se dividen en dos de acuerdo con sus asociaciones biológicas y disponibilidad nutricional:

- Los que no tienen enlaces covalentes y son solubles y completamente fermentables a nivel ruminal.
 - Los que tienen uniones covalentes y son parcial o completamente indigestibles
- ❖ **Celulosa.** Es el carbohidrato que prevalece más en el mundo, representa del 20 al 40 % de la materia seca de la planta (Van Soest, 1994) está conformada por seis átomos de carbono, tiene estructura plana y fibrilar, posee microfibrillas que rodean a la célula, esta característica hace que la celulosa se insoluble y demasiado resistente a la degradación por enzimas (Elizondo *et al.*, 1996; Chaudhry, 1998).
- ❖ **Hemicelulosa.** Es una mezcla de distintos polímeros de monosacáridos como la glucosa, xilosa, manosa arabinosa y galactosa (Elizondo *et al.*, 1996; Chaudhry, 1998), su forma y estructuras que la componen hace que posea mayor resistencia ya que se une a la lignina. Es más degradable que la celulosa, es un carbohidrato soluble en álcalis o ácidos diluidos (Díaz y Hicks, 1988).
- ❖ **Pectina.** La pectina se encuentra en los espacios que existen entre la pared celular de las plantas, se conforma de moléculas unidas por ligaduras tipo α , por tanto, los mamíferos no tienen la capacidad de degradarlas al no poseer las enzimas capaces de hidrolizarlas, por lo que la degradación depende de los microorganismos (Elizondo *et al.*, 1996).
- ❖ **Lignina.** Es una estructura compleja formada por ligaduras de carbono-a-carbono y de éter, resistente al ácido y álcalis. Se encarga de dar soporte y estructura a la pared celular de las plantas, la cantidad de lignina aumenta conforme madura la planta y sus enlaces con la celulosa y hemicelulosa hacen que disminuya la digestibilidad (Adogla-Bessa *et al.*, 1999; Van Soest, 1994).

Las fracciones básicas de un alimento son carbohidratos, nitrógeno, grasa y cenizas; a su vez los carbohidratos se dividen en: fracción soluble (a), fracción insoluble pero

potencialmente degradable (B) y una fracción no degradable (1-D) (Estrada, 2005); de esta manera resulta importante determinar la degradación, tasas de pasaje, y digestibilidad de estas fracciones (Herrero *et al.*, 1998).

La fracción potencialmente degradable de un alimento (a) se divide en dos fracciones más, azúcares y almidones (Sniffen *et al.*, 1992), este fraccionamiento puede proporcionar mejores resultados (Herrero *et al.*, 1998). Lo anterior se puede lograr empleando la técnica de producción de gas *in vitro* colocando el alimento a evaluar en conjunto con líquido ruminal, una solución amortiguadora y a una temperatura de 39 ° C, donde los alimentos producirán determinada cantidad de gas por acción de los microorganismos, produciendo un modelo dinámico de fermentación del alimento.

La fase *lag* es el tiempo que transcurre hasta que los microorganismos comienzan a atacar el material insoluble (fracción B) y a producir gas.

La tasa “c” es la producción de gas por hora (h^{-1}). La fase asintótica representa el volumen de gas producto de la fracción a (mL) y la fracción B (mL) del alimento. La producción de gas total es la suma de la fracción soluble e insoluble en mililitros (Estrada, 2005).

El conocer la solubilidad de los forrajes (fracción a), la fracción insoluble pero potencialmente fermentable (B), así como la tasa de degradación es determinante principalmente en forrajes de baja calidad.



Figura 1. Digestión y absorción de carbohidratos en rumiantes

2.8.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles

Es sabido que los rumiantes llevan a cabo un proceso de fermentación en el rumen, este proceso transforma parte de la materia orgánica ingerida en biomasa microbiana, ácidos grasos volátiles (AGV), gases de fermentación como metano y bióxido de carbono, además de calor (Figura 1) (Tamminga y Williams, 1998).

Los ácidos grasos volátiles mayormente producidos son acetato, propionato y butirato (Beever y Mould, 2000) y en menor cantidad valerato, isovalerato y 2-metilbutirato (France y Siddons, 1998). La cantidad y proporción de los ácidos grasos volátiles que se produzcan en el rumen va a depender de la alimentación que esté recibiendo el animal (Tamminga y Williams, 1998), los carbohidratos mayormente fermentados son la celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares solubles. Los lípidos y proteínas también contribuyen a la formación de AGV's.

Gran parte de los AGV's. producidos a nivel ruminal se pierden por absorción de la pared ruminal a través de difusión simple (France y Siddons, 1998) y una cantidad menor (10-20%) pasa al omaso y abomaso para ser absorbida por estos órganos.

2.9. Importancia de los ácidos grasos en los productos de rumiantes

Los ácidos grasos son componentes naturales de las grasas y los aceites. Tomando como referencia su estructura química, se pueden clasificar en tres grupos: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

Los ácidos grasos saturados están presentes principalmente en alimentos de origen animal, como la carne, manteca, embutidos, mantequilla y queso, pero también en el aceite de palma y en el de coco. La mayoría de los ácidos grasos insaturados provienen de las plantas y los pescados grasos. Los productos cárnicos contienen tanto grasas saturadas como insaturadas. Los ácidos grasos poliinsaturados son de gran interés ya que el organismo no los puede sintetizar, dentro de la familia de ácidos grasos poliinsaturados, dentro de este grupo existen dos grupos diferentes: los ácidos grasos omega-3 y los ácidos grasos omega-6. De acuerdo con su longitud, los ácidos grasos se dividen en cadena corta (< de 12 carbonos), de cadena media (12 a 17 carbonos) y cadena larga (18 o más número de carbonos).

Existe un gran interés para alterar la composición de los ácidos grasos (AG) de los productos de rumiantes, con el objetivo de mejorar la salud a largo plazo de los consumidores.

La grasa de la leche y los productos lácteos contribuyen de modo importante al consumo de ácidos grasos y vitaminas en la dieta humana, asimismo tiene un papel crítico en los atributos sensoriales de estos alimentos (Demment y Allen, 2004; Chilliard y Ferlay, 2004). Existe una apreciación del consumidor de que los productos de los rumiantes, como carne, leche y derivados tienen un alto contenido de grasa y son considerados causantes de algunas enfermedades de humanos; en este sentido, en países desarrollados, el alto consumo de ácidos grasos saturados (AGS) está asociado con la leche y productos lácteos (Valsta *et al.*, 2005), lo cual ha contribuido a una imagen negativa para estos productos. La grasa en leche típicamente contiene una alta proporción de AGS (70-75%), ácidos grasos monoinsaturados (20-25%) y cantidades pequeñas de ácidos grasos poliinsaturados (5%) (Lock y Shingfield, 2004). Menos de 40% de los AGS están considerados dentro de la categoría de ser poco saludables (Elgersma *et al.*, 2006).

La grasa de la leche se caracteriza por la existencia de ácidos grasos de longitud media (C8:0 a C12:0), que son específicos de la glándula mamaria. En los rumiantes predominan los ácidos grasos de bajo peso molecular como el butanoíco (C4:0) y hexanoíco (C6:0) que constituyen el 0.05% de los ácidos grasos volátiles sobre una base molar. Los AG en leche tienen distinto origen (Angulo *et al.*, 2009):

- 1) Los triglicéridos circulantes en sangre en forma de lipoproteínas procedentes de la grasa de la ración.
- 2) Los triglicéridos de las reservas corporales, cuando el animal se encuentra en balance de energía negativo.
- 3) Ácidos grasos producto de la biohidrogenación en el rumen y la acción de la enzima Δ^9 desaturasa a nivel tisular.

Las características de los alimentos que componen la dieta humana se han convertido en una consideración cada vez más importante como estrategia para mejorar la salud (Parodi, 2004). Tanto los cambios en la conducta de la sociedad hacia conceptos medioambientales y programas enfocados al bienestar animal, como una creciente

demanda del consumidor por productos más saludables, todo esto conlleva a cambiar las prácticas tradicionales e explotación ganadera hacia estrategias que proporcionen alimentos deseables y cumplan con estos estándares (Elgersma *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, el interés de los consumidores por dietas enriquecidas en nutrientes con efectos demostrados en la prevención de enfermedades se ha visto potenciado en las últimas décadas. En la actualidad existen normas nutricionales para humanos que enfatizan la importancia de mantener una dieta equilibrada para reducir la incidencia de enfermedades no contagiosas, tal es el caso de la diabetes, la obesidad, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Leaf *et al.*, 2003).

En este contexto, los lípidos adquieren una notable importancia como constituyente de la dieta de los humanos; en la actualidad esta dieta tiende a ser hipercalórica, fundamentalmente al exceso de grasas, además de ricas en ácidos grasos saturados que son factores de riesgo muy importantes para padecer enfermedades cardiovasculares (Williams, 2000).

Subjetivamente, existe una mala apreciación del consumidor hacia los productos de los rumiantes, entre ellos la leche, que se asume tienen un alto contenido de grasa. De hecho, el alto consumo de ácidos grasos saturados es asociado en países desarrollados con los productos lácteos (Valsta *et al.*, 2005).

La grasa de la leche contiene un 75% de ácidos saturados, que en gran parte son consecuencia de la biohidrogenación microbiana en el rumen (Lock y Shingfield, 2004), pero menos del 40% de los ácidos grasos saturados están dentro de la categoría de menos saludables (Elgersma *et al.*, 2006).

Actualmente alrededor del 2 % del total de los ácidos grasos en la leche son polinsaturados.

Dado que los alimentos provenientes de los rumiantes como la carne y productos lácteos son la mejor fuente de ácido linoleico conjugado (>90%) para humanos (Chouinard *et al.*, 1999), la atención actual está en incrementar la concentración de ácidos grasos deseables en productos de los rumiantes. Alterando el perfil de ácidos grasos de la grasa consumida disminuirá el nivel de ácidos grasos saturados indeseables y

con ello se disminuirá el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Elgersma *et al.*, 2006).

La manipulación de la dieta ha sido una de las herramientas más importantes para aumentar los ácidos grasos deseables en productos de origen animal (Jiang *et al.*, 1996) y sigue siendo un punto importante de investigación en nutrición animal.

2.9.1. Metabolismo de los lípidos en rumen

Mientras la dieta se encuentra dentro del rumen una pequeña cantidad de ácidos grasos (AG) de la dieta es absorbido y metabolizado a ácidos grasos volátiles o bióxido de carbono. Los microorganismos ruminales son capaces de sintetizar cantidades importantes de ácidos grasos. De esta manera los ácidos grasos que alcanzan el duodeno son de origen dietético y resultado de la actividad microbiológica en el rumen. El proceso de digestión que sufren los lípidos de la dieta durante la fermentación ruminal, haciendo énfasis en los procesos principales en las que están implicados los lípidos esterificados, son: la lipólisis y la biohidrogenación (Harfoot, 1978), ambos procesos tienen lugar en el rumen por la población bacteriana, se dice que pueden llegar a reducir un 70-80% de los ácidos grasos polinsaturados transformándoles a saturados, principalmente ácido esteárico, o a isómeros *trans* de ácidos grasos monoinsaturados (Figura 2).

2.9.1.1. Lipólisis

En el rumen, la lipólisis comprende la liberación de los AG del éster, para dejarlos de forma libre y dar paso a la biohidrogenación (Figura 2).

En al lipólisis los lípidos esterificados ingeridos son hidrolizados rápida y extensivamente para las lipasas bacterianas y protozoarias.

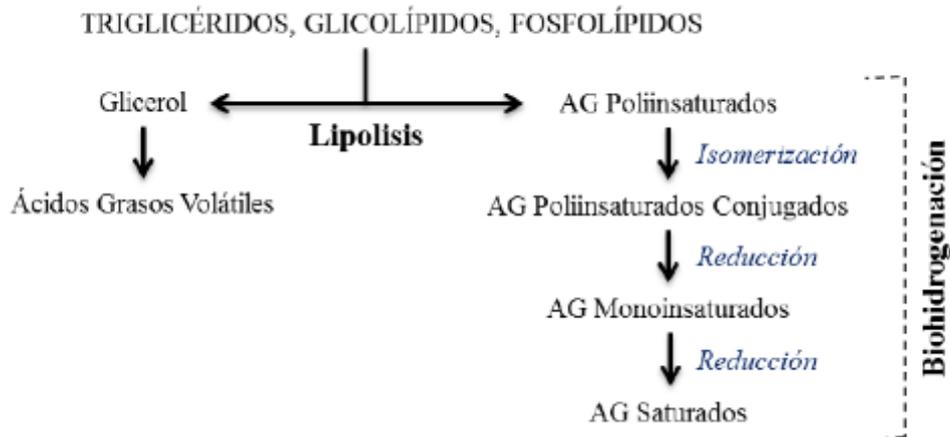


Figura 2. Lipólisis y biohidrogenación (adaptado de Buccioni *et al.*, 2012).

2.9.1.2. Biohidrogenación

Posterior a la lipólisis, sucede la biohidrogenación, la cual reduce el número de dobles enlaces de la cadena de carbono. La biohidrogenación se lleva a cabo por bacterias ruminales, entre ellas *Butirivibrio fibrisolvens*, *Propionobacterium filicina* y *Propionobacterium acnés*.

El paso inicial en la biohidrogenación del ácido linoleico (C18:2 c9c12) es una reacción de isomerización que convierte el doble enlace de c12 en isomería t11 formando el ácido linoleico conjugado (CLA, C18:2 c9t11). La acción reductasa sobre el doble enlace c9 del CLA lo transforma a ácido vaccenico (C18:1 t11), finalmente ocurre otra acción reductasa originando ácido esteárico (c18:0). La isomerización inicial produce probablemente isómeros C18:1 t11 (Griinari y Bauman, 1999) (Figura 3).

La biohidrogenación de ácido linolenico (C18:3 c9c12c15) también produce ácido vaccenico (Henderson, 1975). La primera reacción es una isomerización produciendo C18:3 c9t11c15, seguida por una hidrogenación produciendo C18:2 t11c15 pueden ser considerados productos finales de la biohidrogenación porque pueden no ser hidrogenados más adelante (Harfoot, 1978) (Figura 3).

Los AG que escapan de la biohidrogenación pueden llegar a la glándula mamaria y ser secretados en la leche.

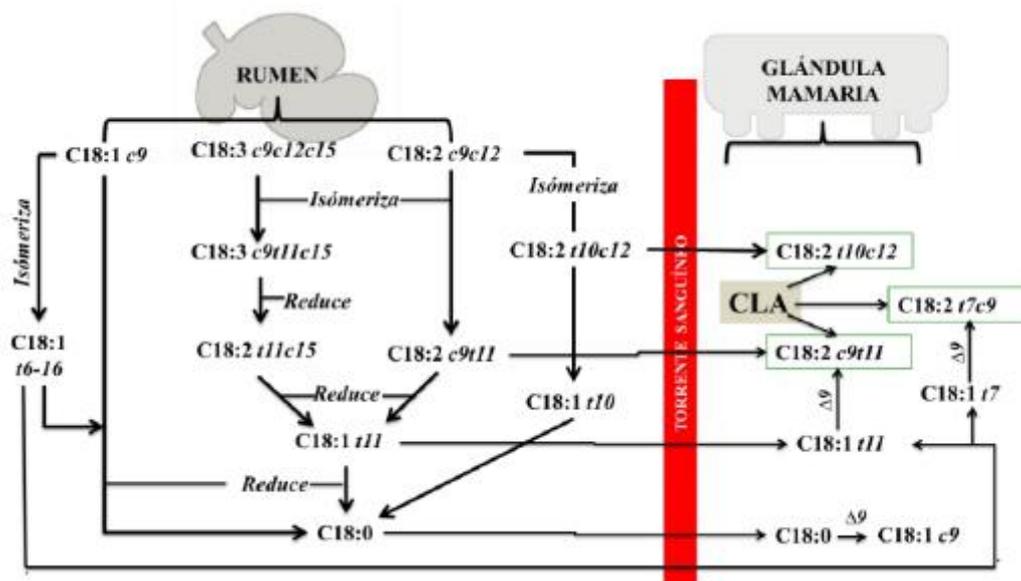


Figura 3. Formación de los isómeros más importantes del CLA en la leche (Vieyra, 2017)

2.9.2. Ácido linoleico conjugado (CLA)

El ácido linoleico conjugado es un término que incluye a los ácidos grasos (C18:2 C9 C12) involucrado en un doble enlace conjugado en las posiciones 8, 10,11, y 13. El CLA es generado en el rumen como producto intermediario de la biohidrogenación del ácido linoleico a ácido esteárico (Chin *et al.*, 1992), esta fracción de CLA sintetizada en el rumen puede ser absorbida y secretada como parte de la grasa de la leche. (Bauman *et al.*, 2000).

El C18:3 c9 c12 c15 se isomeriza a C18:3 c9 t11 c15, posteriormente se reduce a C18:2 t11 c15 y después a C18:1 t11 y por último al C18:0; similarmente el C18:2 c9 c12 se isomeriza en C18:2 c9 t11, después se reduce en C18:1 t11 y en su mayoría termina en C18:0. Los AG producidos en el proceso de biohidrogenación del rumen se han encontrado en la leche, pero la mayor parte del C18:2 c9 t11 proviene de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria por acción de la enzima Δ^9 desaturasa utilizando el C18:1 t11 como sustrato (Bauman *et al.*, 1999; Sun y Gibbs, 2012).

Algunas propiedades benéficas del CLA son la reducción de grasa corporal, alteración de la metabolización de nutrientes, efectos antidiabéticos, reducción en el desarrollo de aterosclerosis, (Belury, 1995; Houseknecht *et al.*, 1998).

El principal isómero del CLA es el C18:2 c9 t11 que llega a representar entre el 75 al 90% del total de isómeros del CLA en leche (Belury, 2002; Bauman *et al.*, 2006), el cual se ha asociado a una reducción de la incidencia de tumores en modelos animales (Ip *et al.*, 1999) y posiblemente en humanos (Aro *et al.*, 2000; Belury, 2002).

Aproximadamente 75% de CLA que ingerimos proviene de los productos lácteos, y su presencia en leche está relacionada con la biohidrogenación de los AGPI en el rumen (Bauman *et al.*, 2006).

2.10. La alimentación para modificar el contenido de ácidos grasos en los productos de rumiantes

Los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el linoleico (C18:2 c9c12) y linolénico (C18:3 c9c12c15) se encuentran en abundantes proporciones en forrajes e ingredientes lipídicos como lo son aceites vegetales y de animales de origen marino (Bauman *et al.*, 1999). Estos ácidos grasos se agregan en la alimentación de rumiantes, con el objetivo de mejorar la calidad y el perfil lipídico de productos provenientes de rumiantes (leche y carne). Es bien sabido que la composición de ácidos grasos en leche y carne de rumiantes se caracteriza por poseer mayor cantidad de ácidos grasos saturados que insaturados (Bauman *et al.*, 1999), producto de la biohidrogenación a nivel ruminal. Por lo tanto, es importante dominar el metabolismo de los ácidos grasos a nivel ruminal con miras a mejorar el perfil de ácidos grasos de productos como la leche y la carne.

Existen diversos factores que afectan el proceso de biohidrogenación del ácido linoleico y ácido linolénico, quizá el de mayor relevancia e importancia son las estrategias de alimentación que han mostrado resultados positivos en el incremento de ácido vaccénico y ácido linoleico conjugado, ya sea en el líquido ruminal o bien en leche y carne (Harfoot y Hazlewood, 1997).

Los factores ligados a la modificación de los ácidos grasos en productos de rumiantes se agrupan principalmente en dos categorías:

1) Intrínsecos o propios del animal, entre los cuales destacan, edad, raza, etapa de lactación y la condición corporal (busca una referencia); y

2) Extrínsecos como clima, época del año, sistemas de producción y principalmente alimentación.

La alimentación, es el factor clave para obtener productos más saludables; se dice que por esta vía se puede incrementar hasta cinco veces el contenido de ácidos grasos deseables en la grasa de la leche (Bauman *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2001). En este tenor, investigadores en nutrición animal han evaluado estrategias alimenticias que alteren la composición de la grasa en leche y carne, disminuyendo el contenido de ácidos grasos saturados, especialmente ácidos grasos de cadena media (láurico, mirístico y palmítico), e incrementando las cantidades de ácidos insaturados de cadena larga (oleico, linoleico, linolenico y CLA).

En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de alimentos que influyen de una manera positiva en el metabolismo de los lípidos, dando lugar a un producto más saludable para el consumidor. Diversos estudios muestran que rumiantes alimentados exclusivamente con pasto, obtienen contenidos de CLA en leche más altos que en donde se aportan dietas completas mezcladas (Kelly *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 1999; White *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2005; Bargo *et al.*, 2006) o suplementando concentrados (Loor *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2003; Wijesundera *et al.*, 2003).

Aunado a ello, existe una correlación positiva entre el porcentaje de pasto en la dieta y el contenido del CLA en la leche (Vibart *et al.*, 2008; Morales Almaráz *et al.*, 2010). Kelly *et al.* (1998) en un experimento con vacas lecheras, donde gradualmente se disminuyó el alimento con dietas completas mezcladas y tuvieron acceso al pastoreo hasta alimentar a las vacas con solo pastoreo, la concentración de C18:3 c9 c12 c15 en la grasa de la leche se triplicó (9.5 vs 3.1 mg/g) y el C18:2 c9 t11 se duplicó (10.9 vs 5.4 mg/g). Por su parte, Dhiman *et al.* (1999) observaron un similar comportamiento, con solo pastoreo y una tercera parte de la dieta total en pastoreo hubo un aumento de alrededor de 150% del ácido linolénico y CLA (8.1 vs 20.2 y 8.9 vs 22.1 mg/g de AG, respectivamente). Vibart *et al.* (2008) observaron un aumento lineal (P8%) decrecen en su mayoría un 1% la grasa en leche (Sutton, 1989), pero contribuye a mejorar la calidad de la grasa de la leche (Lima *et al.*, 2014).

2.10.1. Pastoreo

En la actualidad, se ha notado una tendencia e interés por la inclusión de forrajes frescos en la dieta de rumiantes en todo el mundo; esto por un lado, por la creciente competencia que existe por los granos en la alimentación humana y animal, además del

uso de estos para la fabricación de biocombustibles, lo cual conlleva a incrementar el costo de los mismos. Otra ventaja que hay al alimentar a los rumiantes con forrajes frescos es que aumenta la proporción de ciertos ácidos grasos benéficos (ácido ruménico y ácido vaccénico) que pueden tener beneficios nutricionales en el humano como promover la buena salud y prevenir las enfermedades (Elgersma *et al.*, 2006); esto es debido a la elevada proporción de ácido linolénico en forraje de pasto.

La ingesta de ácido linoleico en rumiantes aumenta la síntesis de ácido vaccénico en el rumen, el cual es convertido en CLA en la glándula mamaria por acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (Bauman *et al.*, 2008). Se sabe que parte del ácido linoleico no es biohidrogenado en el rumen pero se absorbe intacto a nivel intestinal y es secretado en la leche. No obstante, una limitación al incluir forrajes en las dietas es la dificultad de lograr consumos adecuados de materia seca y cumplir los requerimientos nutricionales, pudiendo obtener producciones menores a las esperadas (Kolver y Muller, 1998; Bargo *et al.*, 2002). Morales-Almaráz *et al.* (2010) observaron aumentos lineales en la producción de ácido ruménico y ácido linolénico en la grasa de la leche al aumentar el tiempo de acceso a forraje fresco. Mendoza *et al.* (2016) reportaron características más sanas en leche provenientes de vacas con 8 horas de acceso a pastoreo comparado con vacas con acceso a 0 y 4 horas de pastoreo; respecto al ácido vaccénico fue más alto con 36 % en vacas con 8 horas de pastoreo vs 0 horas de pastoreo, el ácido ruménico incrementó en un 61 % y el ácido linoleico conjugado un 34 %.

2.10.2. Uso de aceites y semillas de oleaginosas

La adición de lípidos en las dietas para rumiantes puede tener varias ventajas, por ejemplo: incrementar la energía de las dietas, debido a que las grasas contienen hasta tres veces más energía neta para lactación en comparación con los alimentos abundantes en proteína y carbohidratos (Palmquist, 1984), reducen el riesgo de acidosis ruminal y caída del porcentaje de grasa en la leche por la inclusión de altos niveles de granos en la dieta (Palmquist, 1988), mejoran la composición de grasa en la leche ya que se incrementa el suministro de AG insaturados de cadena larga, CLA y se disminuye el aporte de AG saturados (Parodi, 1999).

Una ingesta elevada de AGPI por parte del animal se asocia a un incremento de las concentraciones de AG insaturados en la grasa de la leche y, en particular del CLA (Walker *et al.*, 2004). Un efecto negativo de la adición de grasas es la disminución de proteína en leche, esto parece ser resultado de un efecto de dilución al incrementar el volumen de leche (Schroeder *et al.*, 2004). Estudios indican que la presencia de AGPI inhibe la actividad y fermentación microbiana en el rumen, producto de esto es posible que la digestibilidad de la fibra se vea disminuida (Eastridge y Firkins, 1991).

Es bien sabido que las grasas que aportan los aceites y semillas de oleaginosas son de las más indicadas para modificar el perfil de ácidos grasos de la leche a través de la dieta. Algunos de los efectos observados en la grasa láctea al agregar aceites y semillas son similares, el contenido de ácido butírico no suele afectarse negativamente (Mustafa *et al.*, 2003; Bodas *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2006), se reduce el de los AGS de cadena media y aumenta el nivel de ácidos grasos de 18 átomos de carbono, especialmente los ácidos grasos monoinsaturados (Collomb *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Bu *et al.*, 2007).

Chilliard y Ferlay (2004) mencionan que dicha respuesta puede tener dos orígenes; por un lado, la disminución de la producción de ácidos grasos volátiles a nivel ruminal, debido a los efectos de los ácidos grasos insaturados sobre la fermentación microbiana de las paredes base de vegetales, que reduciría la cantidad de sustrato (acetato) disponible para la síntesis de *novo* de AGS de cadena corta y media en las células mamarias. De igual manera, la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de *novo* podría inhibirse por el aumento de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena larga para la ubre debido a su mayor absorción en el intestino.

La inclusión de lípidos no protegidos en la dieta de los rumiantes puede afectar negativamente a la población microbiana del rumen con el consiguiente efecto sobre los parámetros de fermentación ruminal y la digestión de los componentes de la dieta (Sauvant y Bas, 2001). Para reducir este efecto de interacción, es recomendable proteger los lípidos que se suministraran en la dieta mediante procedimientos físicos o químicos, por ejemplo: encapsulación, hidrogenación, tratamiento con sales de calcio y acilamidas (Jenkins, 2004). Al proteger los lípidos es posible disminuir o nulificar el efecto negativo sobre la digestión de los componentes de la dieta (Silva *et al.*, 2007;

Gangliostro y Schroeder, 2007). Una ventaja más a considerar al incluir lípidos protegidos en la dieta es que es posible incrementar los AG disponibles para la absorción a nivel intestinal sin afectar la fermentación ruminal (Jenkins y Bridges, 2007).

Se ha observado una disminución de proteína en la leche de vacas en producción cuando se alimentan con la inclusión de semillas de oleaginosas o harina de pescado y extruidos de soya en su dieta, ricos en AGPI, los cambios se atribuyen al efecto dilución por aumento de la producción de leche (Lock y Shingfield, 2004), aunque probablemente también se deba a la disminución de aminoácidos que aporta la población microbiana afectada por la inclusión en la dieta de estos AGPI (Relling y Mattioli, 2007).

La inclusión de aceite de pescado está estrechamente ligada con una disminución en la producción de leche y del contenido de grasa de ella, además de que los ácidos grasos presentes en estos aceites son altamente susceptibles a la oxidación (Haro *et al.*, 2006). A su vez Kairenius *et al.* (2015) reportan una disminución en el consumo de materia seca y baja producción de leche al día al incrementar la adición de aceite de pescado en la dieta (0, 75, 150 y 300 g/d). Esto se puede explicar debido que existe una interacción con los microorganismos del rumen (Jenkins, 1993).

Por tanto, la inclusión de lípidos de origen vegetal en la dieta de rumiantes, además de cubrir parte de los requerimientos energéticos, puede acarrear efectos benéficos a la salud humana por el aporte de AG insaturados a través de sus productos y derivados (Schmid *et al.*, 2006; Martínez-Marín *et al.*, 2013).

2.10.3. Uso de ensilados

Los métodos de conservación de forrajes, como henilaje o ensilaje, afectan el contenido de ácido linolénico y de CLA cis-9 trans-11 en la grasa de la leche, debido a que el forraje conservado disminuye la concentración de linolénico y aumenta la de palmítico (Noble *et al.*, 1974). La alimentación con forrajes frescos resulta en efectos más positivos que una alimentación basada en forrajes conservados, ya que el forraje fresco presenta un mayor contenido de ácido linolénico (Chilliard *et al.*, 2001).

La oxidación durante el marchitamiento y la biohidrogenación en el rumen son de las principales causas de pérdidas de ácidos grasos polinsaturados en el forraje. Ueda *et al.*

(2002) no encontró diferencias en la concentración total de AG y la composición entre ensilado de legumbres y el forraje fresco, pero para heno de alfalfa y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) hubo grandes disminuciones, en comparación con leguminosas frescas, tanto en el total de ácidos grasos como de C18:3 c9 c12 c15.

French *et al.* (2000) encontró niveles similares de ácidos grasos en ensilado de pasto y pasto, pero el pasto fresco mostró una proporción más baja de ácidos grasos saturados y una mayor proporción de insaturados con respecto a el pasto ensilado. El uso de aditivos también puede afectar las concentraciones de AG. Dewhurst y King (1998) encontraron que al usar aditivos tuvieron efectos importantes sobre los parámetros generales de fermentación, los efectos sobre los niveles y proporciones de AG en el ensilado de pasto de centeno perenne relativamente menores. Warren *et al.* (2002) encontraron que el uso de ácido fórmico o inoculantes bacterianos disminuyó las concentraciones totales de AG en ensilados de raigrás perenne y trébol rojo. Para nuestro conocimiento, no se reportan datos de la inclusión de ensilado de canola como alternativa para modificar el perfil lipídico de la leche o carne de rumiantes.

III. JUSTIFICACIÓN

Los forrajes constituyen la parte más importante en la alimentación del ganado, estos pueden integrar la totalidad de la dieta en etapas donde los requerimientos no son muy demandantes. En la actualidad las tierras destinadas a la producción de alimento para el ganado están disminuyendo considerablemente, es por lo que se requiere obtener el máximo potencial de los terrenos cultivables para la obtención de forrajes.

Es importante considerar que en la producción de forrajes existe una marcada estacionalidad en la mayoría de los países, por lo que resulta de gran importancia obtener abundantes cantidades de forraje en verano sin perder la calidad nutritiva para su posterior uso en invierno; una estrategia ampliamente utilizada es el ensilaje de los forrajes, que además de ser una técnica económica, permite conservar las propiedades nutricionales de los alimentos.

Por tanto, es necesario proponer estrategias de alimentación mediante el uso de diversos forrajes que optimicen los recursos y sean de alta calidad, además de que contribuyan a obtener como producto final alimentos, como la carne y leche de los rumiantes, ricos en componentes funcionales.

El forraje de canola tiene un alto aporte de proteína y ácidos grasos polinsaturados, sin embargo posee componentes anti nutricionales, por lo que no se recomienda ofrecer en grandes cantidades en dietas de rumiantes que limitan su consumo, por lo cual es importante evaluar su perfil nutricional, sola o en combinación con ensilado de maíz, así como parámetros de producción de gas *in vitro*, digestibilidad producción de nitrógeno amoniacal, metano y producción de intermediarios de ácidos grasos polinsaturados *in vitro*.

Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la calidad del ensilado de canola solo o en combinación con ensilado de maíz, siendo estos la única fuente de forraje en la alimentación de rumiantes.

IV. HIPÓTESIS

La melaza como aditivo aplicado al forraje de canola favorece su conservación como ensilado mejorando su calidad en composición química, producción de gas y digestibilidad *in vitro*.

La inclusión en diferentes proporciones de ensilado canola- maíz favorece la cinética de fermentación ruminal *in vitro* y la producción de intermediarios de la biohidrogenación de los ácidos grasos polinsaturados.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar la proporción óptima de ensilado de canola-maíz adicionando diferentes niveles de melaza que permita mejorar el aporte de energía, proteína, digestibilidad, la cinética de fermentación *in vitro* y la producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados.

Objetivos específicos

- Evaluar la ensilabilidad del forraje de canola con cuatro niveles de melaza
- Determinar la composición química de diferentes proporciones de ensilado canola-maíz adicionando cuatro niveles de melaza.
- Evaluar la cinética de fermentación ruminal y la digestibilidad *in vitro* de diferentes proporciones de ensilado canola-maíz adicionando cuatro niveles de melaza.
- Cuantificar la concentración de metano y nitrógeno amoniacal de diferentes proporciones de ensilado canola-maíz adicionando cuatro niveles de melaza.
- Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes proporciones de ensilado de maíz-ensilado de canola sobre la producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados.

VI. MATERIALES Y METODOS

Se realizaron dos experimentos con el ensilado de canola; en el primer experimento se determinó el valor nutritivo, cinética de producción de gas, digestibilidad, nitrógeno amoniacal, producción *in vitro* de gas metano y perfil de ácidos grasos del ensilado de canola con cuatro niveles de melaza. En el segundo experimento se evaluó la producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación del ensilado de canola (EC) en sustitución del ensilado de maíz (EM), la digestibilidad, así como la cinética de producción de gas y nitrógeno amoniacal.

Área de estudio

El cultivo de canola se estableció en el municipio de Ixtlahuaca, Estado de México, cuyas coordenadas geográficas son: 19° 28' 06" al 19° 44' 03" latitud norte y 99° 40' 43" al 99°54'59" longitud oeste; la altura promedio es de 2500 msnm, el clima es templado subhúmedo, la precipitación media anual es de 828.4 mm y la temperatura media anual es de 14.8° C. La siembra del maíz y elaboración de microsilos se realizó en el Área de Producción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, y los análisis de laboratorio en el Departamento de Nutrición Animal de la misma Facultad, localizada a 19° 24' 48" latitud norte y 99° 40' 45" longitud oeste, a una altura de 2632 metros sobre el nivel del mar, el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano.

Establecimiento del cultivo

La siembra de canola (*Brassica napus* var Monty) se realizó el día 15 de octubre de 2017, a una densidad de siembra de 6 kg/ha, el cultivo se fertilizó con N a una dosis de 100kg/ ha, se realizaron dos riegos a los días 80 y 120 post siembra.

Desarrollo experimental: elaboración de ensilados

El forraje se cosecho a los 148 días post siembra y fue picado a un tamaño de partícula de 10 mm con una maquina Swisssmex modelo SW610500. La melaza se diluyó en agua en proporción 1 a 1 (p/v) para facilitar el mezclado. Posteriormente, se elaboraron los microsilos en tubos de PVC (4 pulgadas de diámetro por 20 cm de largo) utilizando una prensa manual para la compactación del forraje. Los microsilos fueron sellados con bolsas de plástico y cinta adhesiva.

Experimento 1: ensilado de canola con cuatro niveles de melaza

En el experimento 1, los tratamientos fueron distintos niveles de melaza adicionados al ensilado de canola con respecto al peso fresco: 0% melaza (EC-0), 1% de melaza (EC-1), 2% de melaza (EC-2), 3% de melaza (EC-3) y 4% de melaza (EC-4).

Experimento 2: Mezcla de ensilado canola y ensilado de maíz

Los tratamientos que se evaluaron fueron derivados de la asociación (% base seca) de ensilado de maíz (EM) y ensilado de canola (EC): T1= 100% EM; T2= 80% EM-20% EC; T3= 60% EM-40% EC; T4= 40% EM-60% EC; T5= 20% EM-80% EC.

Los microsilos de ensilado de canola se destaparon a los 28 días post sellado e inmediatamente se midió el pH con un potenciómetro (marca OAKTON®).

Análisis de laboratorio

Para cada uno de los tratamientos se determinó materia seca por desecación de la muestra en estufa (105°C/24h), el resultado obtenido fue ajustado por un factor de corrección de 1.08 (Dulphy y Demarquilly, 1981) para no subestimar pérdidas de compuestos volátiles. Para la elaboración del análisis de composición química, una submuestra se secó a 60°C hasta presentar peso constante para aminorar los daños por calor.

Las muestras de ensilados se molieron con un molino Willey empleando una malla de 2 mm. En el caso del experimento dos se realizaron las mezclas con los niveles de ensilado de maíz y ensilado de canola respectivos de cada tratamiento. Se determinó el contenido de materia orgánica (AOAC, 1990); el contenido de nitrógeno se obtuvo por el método kjeldalh (AOAC, 2012); el análisis de FAD y FND se realizó de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991). El contenido de energía bruta se determinó con una bomba calorimétrica (Parr 6400 calorimeter).

Producción de gas *in vitro*

La cinética de fermentación se evaluó mediante la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Theodorou *et al.* (1994). El líquido ruminal se colectó de una vaca fistulada, múltipara, raza Holstein/Pardo Suizo, con peso promedio de 550 kg y alimentación basada en 60 % forraje y 40% concentrado comercial. La recolección de líquido ruminal se realizó a las 07:00 h, se filtró a través de cuatro capas de tela manta

de cielo, y se colocó en un termo calentado previamente a 39° C, este se transportó rápidamente al laboratorio para la incubación. El líquido ruminal se mantuvo gasificado con CO₂ para mantener condiciones de anaerobiosis en el laboratorio.

Se realizaron tres tandas de incubación, utilizando botellas ámbar de vidrio con capacidad de 120 ml, se incubó 0.99±0.01 g de muestra en cada botella por cuadruplicado; en cada corrida de incubación se incluyeron cuatro blancos. A cada botella se le adicionaron 90 ml de solución nutritiva y 10 ml de líquido ruminal. Las mediciones de producción de gas se realizaron con un transductor de presión (Delta OHM®) a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 72, 84 y 96 post incubación.

Para determinar los parámetros de fermentación ruminal se utilizó el modelo matemático propuesto por Jessop y Herrero (1996):

$$GP = a \times (1 - \exp(-ca + t)) + b \times (1 - \exp(-cb \times (t - \text{lag}))) \times (t > \text{lag}) - 1$$

Dónde:

GP = Producción acumulada de gas (ml)

a = Producción de gas a partir de la fermentación (ml) de la fracción soluble de los carbohidratos

b = Producción potencial de gas (ml) a partir de la fracción insoluble pero potencial degradable

ca = Tasa de fermentación de la fracción **a**

cb = Tasa de fermentación de la fracción **b**

lag = Tiempo que transcurre antes de iniciar la fermentación de la FDN.

Para la realización de los ajustes de la curva de producción de gas se utilizó el programa Grafit v3.

Digestibilidad aparente de materia seca, materia orgánica y fibra detergente neutro.

Finalizado el tiempo de incubación se evaluó la digestibilidad *in vitro*, se emplearon dos repeticiones para medir la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), el sustrato final se filtró en crisoles Gooch (#1), se secó en estufa a 105°C por una hora; se registró el peso y finalmente se determinó la digestibilidad de la MS por diferencia de peso entre la MS inicial y la MS residual; la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la

materia orgánica (DIVMO) se obtuvo mediante la incineración de la muestra residual en una mufla a 450° C por 4.5 h, el cálculo se realizó por diferencia de peso entre la MO inicial menos la MO residual (Aragadvay *et al.*, 2015).

La digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutro (DIVFDN) se determinó con los residuos de la fermentación adicionando 50 ml de solución FDN; posteriormente se introdujeron en una autoclave (Tuttnauer®) a 105°C por una hora, se filtraron en crisoles Gooch (#1) y el residuo se colocó en una estufa a 105°C por una hora, se registró el peso seco del residuo. El cálculo de la DIVFDN se realizó por diferencia de peso entre el contenido de FDN inicial en la muestra menos el contenido de FDN residual (Pell y Schofield, 1991).

Nitrógeno amoniacal

La producción de nitrógeno amoniacal *in vitro* se cuantificó a las 72 horas post incubación (Theodorou *et al.*, 1994), colocando 5 ml de sustrato y 0.5 ml de ácido tricloroacético (0.25% P/V) (Meale, 2012) en tubos de 10 ml, las muestra se centrifugaron a 4000 rpm y se midieron por reacción fenil-hipoclorito en un espectrofotómetro (SUV 5000), como estándar se utilizó sulfato de amonio de acuerdo con Broderick y Kang (1980).

Cuantificación de metano

La producción *in vitro* de metano se determinó incubando ocho repeticiones de cada tratamiento de acuerdo con la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994), este se midió a las 24 y 48h de iniciada la fermentación *in vitro* mediante un medidor de gases portátil (Aeroqual serie 500®) provisto por un sensor removible para medir la concentración de metano en ppm. La calibración del sensor se realizó en fabrica (Aeroqual Limited 109 Valley Road, Mt Eden, Auckland 1024, New Zealand).

Intermediarios de la biohidrogenación de ácidos grasos *in vitro*

La producción de intermediarios de la biohidrogenación se realizó incubando los tratamientos de acuerdo a lo descrito por Theodorou *et al.* (1994), las muestras incubadas fueron retiradas a las 6, 9 y 12 horas post inicio de la incubación, al llegar el tiempo de incubación dos botellas de cada tratamiento se colocaron en hielo (Ribeiro *et al.*, 2007) y se les midió el pH, posteriormente fueron liofilizadas para su posterior metilación.

Perfil de ácidos grasos de las muestras de ensilados y sustratos incubados en la producción de gas *in vitro*.

El análisis del perfil de ácidos grasos (AG) de los ensilados y el sustrato de las incubaciones en las diferentes horas se realizó mediante la técnica de Sukhija y Palmquist (1988), con modificaciones de Palmquist y Jenkins (2003), utilizando ácido clorhídrico metanólico al 10% en la esterificación de los ácidos grasos y hexano como solvente orgánico. Los ésteres de los ácidos grasos de los ensilados fueron separados y cuantificados por cromatografía de gases (Perkin Elmer Clarus 500), con una columna capilar de 100m x 0.25mm x 0.2µm (SUPELCO TM-2560), utilizando N₂ como gas acarreador. El detector e inyector se mantuvo a 260°C, la temperatura inicial del horno fue de 140°C por cinco minutos, aumentando 4°C por minuto hasta llegar a 240°C. Cada pico fue identificado de acuerdo con los tiempos de retención de estándares de ésteres metílicos (Supelco 37 Component FAME Mix, de la empresa SIGMA-ALDRICH). Los AG se reportan en g por 100 g del total de AG.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en ambos experimentos fueron analizados con ayuda del programa SAS (2002) utilizando un diseño completamente al azar, el modelo general lineal fue: $Y = \mu + T_i + E_{ij}$, Dónde: Y , es la variable respuesta; μ , es la media general; T_i , es el efecto del tratamiento; e_{ij} es el error experimental. Al observarse diferencias significativas ($P < 0.05$) se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Artículo de investigación enviado a la revista: Tropical Animal Health and Production.

17/7/2018

Correo - emoralesa@uaemex.mx

TROP: Your PDF Has Been Built

em.trop.0.5c7882.8081a112@editorialmanager.com en nombre de
Tropical Animal Health and Production <em@editorialmanager.com>

mar 10/07/2018 19:12

To: Ernesto Morales Almaraz <emoralesa@uaemex.mx>

Dear Dr Morales-Almaraz,

The PDF for your manuscript, "Chemical composition, in vitro gas production, methane production and fatty acid profile of canola silage (*Brassica napus*) with four levels of molasses" is ready for viewing.

In order to formally submit your manuscript to the journal, you must approve the PDF.

Your username is: emoralesa

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at
<https://trop.editorialmanager.com/>.

Click "Author Login".

In your main menu, you will see there is a category entitled "Submission Waiting for Author's Approval".
Click on that category, view your submission and approve it. In the unlikely case of conversion issues you may submit your manuscript data as a PDF file.

Your manuscript will then be formally submitted to the journal.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Tropical Animal Health and Production

Chemical composition, *in vitro* gas production, methane production and fatty acid profile of canola silage (*Brassica napus*) with four levels of molasses

Daniel Limón-Hernández¹, Adolfo Armando Rayas-Amor², Anastacio García-Martínez³, Julieta Gertrudis Estrada-Flores⁴, Mayra Núñez López⁵, Rosy G. Cruz Monterrosa², Ernesto Morales-Almaráz^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México,

²Departamento de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad

Lerma. ³Centro Universitario UAEM Temascaltepec de la Universidad Autónoma del Estado de México.

⁴Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la Universidad Autónoma del Estado de México.

⁵Departamento de Matemáticas Aplicadas y Sistemas de la Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Cuajimalpa

*Autor de correspondencia: emoralesa@uaemex.mx; Tel. +52 722 2965548 ext. 116. ORCID: 0000-0003-0675-2193

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of four levels of molasses on chemical composition, *in vitro* digestibility, methane production and fatty acid profile of canola silages. Canola (*Brassica napus* var Monty) crop was established in a small-scale agricultural farm and harvested 148 days after sowing. Four levels of molasse were tested with respect to the fresh weight (1.5 kg); these were 1% (CS-1), 2% (CS-2), 3% (CS-3), 4% (CS-4) molasses and 0% molasses (CS-0) was included as control. A total of 45 microsilages were prepared using PVC pipes (4 inches of diameter x 20 cm of length) and the forage was compressed using a manual press. The effects of control and treatments were tested using the general linear model $Y = \mu + T_i + E_{ij}$. The linolenic acid (C18:3n3), palmitic acid (C16:0) and linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) accounted for 30%, 21%, 10.5% of total fatty acids, respectively; the fermentation parameters and *in vitro* methane production were not affected ($P > 0.05$) by treatments, *in vitro* digestibility decreased significantly ($P < 0.05$) as the level of molasses increased. It was concluded that CS-4 improved the DM content by 9% and showed high content of linolenic acid methyl ester, the *in vitro* methane production was 32% and 7% lower than CS-2 and CS-0, respectively at 24 hours post-incubation.

Key words: Canola, silage, fatty acids, methane, molasses

Introduction

In Mexico, Brassica species are part of traditional dishes (Bye and Linares 2000) for human consumption but in other countries, Brassicas are used for oil production and livestock feeding (Williams et al. 2016; Kincaid et al. 2012), however in Mexico its sowing and use in animal feed is still limited. Canola (*Brassica napus*) is an alternative crop in the winter season with great forage potential, presents high dry matter yields and a nutritional contribution similar or superior to small grain cereal (Cruz et al. 2012) and persists during winter season (Reta et al. 2015). The Brassicas have high dry matter digestibility (81 to 89%) before blooming and metabolizable energy from 2.8 to 3.3 Mcal/ kg DM, these values are higher than most of the grasses or legumes usually used for cattle feeding (Hall and Jung 2008; Barry 2013) and its content of unsaturated fatty acids (Williams et al. 2016) are precursors of vaccenic and rumenic acid which are beneficial to human health (Alexander et al. 1998). Studies have shown that the silage process is a method that contributes to diminish anti-nutritional effects of Brassicas (Fales et al. 1987), and moreover it allows forage conservation without affecting its nutritional value. Nonetheless, it requires an additive for a proper conservation process and molasses is an additive commonly used for silage making due to is a source of energy for microorganisms that produce lactic acid (Baytok et al. 2005). However, there is little scientific literature that investigates the relationship of different molasses levels with the fatty acid profile, digestibility and *in vitro* methane production of Brassica silages. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of four levels of molasses on chemical composition, *in vitro* digestibility, methane production and fatty acid profile of canola silages.

Materials and methods

Canola (*Brassica napus* var. Monty) crop was established in a small-scale agricultural farm (19° 28 '06 " N; 99°54'59" W) at 2667 m. The climate is temperate subhumid, the mean annual rainfall and mean annual temperature is 870 mm and 13.5° C, respectively. Canola sowing was carried out on 15th October 2016 with a sowing density of 6 kg/ ha. The crop was fertilized with 100 kg/ ha N (Urea) and two irrigations were carried out on days 80 and 120 after sowing. Canola crop was harvested and chopped with a Swissmex harvester (model SW610500) at day 148 after sowing (theoretical length of 2.5 cm). Four levels of molasses were tested with respect to the fresh weight (1.5 kg); these were 1% (CS-1), 2% (CS-2), 3% (CS-3), 4% (CS-4) molasses and 0% molasses (CS-0) was included as control. The molasse was diluted in water (1:1 ratio; w/v) to facilitate mixing with canola. The microsílages were made of

PVC pipes (4 inches of diameter x 20 cm of length) and the forage was compressed using a manual press. Nine microsilages (repetitions) of each treatment were prepared, sealed with plastic bags and adhesive tape and after 28 days post-incubation were open. The pH was measured using a OAKTON® probe, after that weighted immediately and taken to the laboratory, the weight was recorded again after drying the samples at 60 °C until constant weight. Afterwards, the samples were ground with a hammer mill to pass through a 2 mm sieve and stored at room temperature for further laboratory analyses.

The chemical composition, gas production technique and *in vitro* digestibility of DM, OM, and NDF were determined following standard procedures described in AOAC (2012) and Theodorou et al. (1994). *In vitro* ammoniacal nitrogen (NH₃-N) quantification was carried out at 72 hours post-incubation (Broderick and Kang 1980; Theodorou et al. 1994). The fatty acid profile of canola silages was obtained following the methodology described in Palmquist and Jenkins (2003) using 10% methanolic hydrochloric acid for esterification, hexane as organic solvent and a capillary column of 100 m × 0.25 mm × 0.2 μm (SULPELCO TM-2560), with nitrogen as carrier gas.

Methane (CH₄) gas was quantified following the gas production technique (Theodorou et al. 1994), the accumulated CH₄ concentration in the head-space of the bottles was measured at 24 and 48 hours post-incubation with an electrochemical methane sensor coupled to a portable analyser (Aeroqual serie 500®). Sensor calibration was carried out by Aeroqual Limited 109 Valley Road, Mt Eden, Auckland 1024, New Zealand.

Statistical analysis

The effects of control and treatments were tested with the general linear model $Y = \mu + T_i + E_{ij}$; where, Y= the response variable, μ = general mean, T_i = treatment effect; e_{ij} = experimental error and the Tukey test was applied when significant differences ($P < 0.05$) were observed. A Pearson correlation analysis was used to evaluate the relationship among variables and linear regression was used to obtain prediction equations of fatty acids, NH₃-N and CH₄. The software SAS (2002) was used.

Results

Significant differences ($P < 0.05$) were observed in the chemical composition of canola silages (Table 1). The DM content increased as the level of molasses increased. The CP content was 4.1% and 2.7% lower for treatments CS-3 and CS-4, respectively. The NDF content decreased as the level of molasses

increased ($P < 0.05$), CS-0 and CS-4 treatments showed the highest GE content. The ADF and pH were not affected ($P > 0.05$) by molasses levels.

The fatty acid profile of silages is shown in Table 1. The C14:0, C16:1 and C18:2n6c in CS-4 were higher than CS-0 ($P < 0.05$). The C12:0, C16:1, C18:1n9c and C18:3n3 in CS-2 and CS-3 were lower than CS-0. Linolenic acid (C18:3n3), palmitic acid (C16:0) and linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) accounted for 30%, 21%, 10.5% of total fatty acids, respectively.

Table 2 shows the fermentation parameters of canola silages with different levels of molasses. The addition of molasses did not affect ($P > 0.05$) fermentation of the soluble carbohydrates (A), fermentation of the structural carbohydrates (B), their degradation rates (c_{-a} , c_{-b}), respectively and the time at which the NDF fermentation begins (Lag phase). Nonetheless, there was an increment in GP at 96 hours (GP96) and fraction A as the level of molasses increased and contrary to the later, fraction B and Lag time decreased. The c_{-a} fraction was 2.6% lower in CS-2 and c_{-b} did not change among treatments.

The *in vitro* digestibility of DM (IVDDM), OM (IVDOM) and NDF (IVDNDF) at 48 hours is shown in Table 3. Both IVDDM and IVDNDF decreased ($P < 0.05$) as the level of molasses increased, IVDDM in CS-0 was the highest and different ($P < 0.05$) to other treatments; the IVDNDF in CS-0 and CS-1 were the highest and different ($P < 0.05$) to other treatments. The IVDOM did not show significant differences ($P > 0.05$); however, CS-3 was 1.6% lower than CS-0.

The *in vitro* $\text{NH}_3\text{-N}$ and CH_4 at 24 and 48 hours post-incubation is shown in Table 4. A significant ($P < 0.05$) increase in the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/dL) was observed as the level of molasses increased. No significant differences were observed ($P > 0.05$) for CH_4 concentration; however, CS-3 and CS-4 had 32% and 18% lower concentration at 24 and 48 hours with respect to CS-2 treatment that showed the highest CH_4 accumulation.

Table 5 shows the Pearson correlation among variables of chemical composition, fermentation parameters, *in vitro* digestibility and the fatty acid profile of canola silages. Lauric acid (C12:0) showed a positive significant correlation ($P < 0.05$) with the ADF, myristic acid (C14:0) with GP96 and the oleic acid methyl ester (C18:1n9c) with GE, the $\text{NH}_3\text{-N}$ with DM content and c_{-b} . On the other hand, C18:1n9c showed a negative significant correlation ($P < 0.05$) with fraction A, linolenic acid methyl ester (C18:3n3)

with palmitic acid (C16:0), >C20:0 with palmitoleic acid (C16:1), NH₃-N with OM, NDF and CH₄ with c.
a*

Table 6 presents the linear regression equations for predicting oleic, linolenic, myristic acids, NH₃-N and CH₄ at 24 hours from the predictors: fatty acids, the GP96 and the degradation rates c_{-a} and c_{-b}; these relationships were significant (P<0.05). The R² of the linear models explained up to 95% of the variability. The linear regression model to predict myristic acid from GP96 showed the lowest R² that explained 82% of the variability in the data, oleic acid could be predicted from the GE (R²= 0.91) and the linolenic acid from palmitic acid content (R²= 0.87).

Discussion

The DM content increased 9% with respect to CS-0 as the level of molasses increased, a similar response was reported by Balakhial et al. (2008) when 4% and 8% of molasses in canola silages were added, they reported values of 17 to 20% of DM (17% increment of DM). When adding or increasing molasses in maize silages higher DM contents were obtained (Baytok et al. 2005). Suárez et al. (2011) reported a higher content of DM when they added 4% of molasses in mixed silages (grasses-legumes). The OM was affected by the addition of molasses because decreased (P<0.05) as the molasses level increased, in this study OM content was higher compared to that reported by Kincaid et al. (2012) who reported 825 g/ kg DM in canola silage. The CP content was different (P<0.05) among treatments; however, Balakhial et al. (2008) did not report differences. Kincaid et al. (2012) reported a CP of 130 g/ kg DM (harvested at 70 days after sowing) that is slightly lower than our mean content (145 g/ kg DM). The CP content of canola silages was higher than that provided by most of the conserved cereals that supply 60 to 100 g/ kg DM (NRC 2000), therefore canola silage could meet the requirements of ruminants in maintenance or growth (Van Soest 1994; NRC 2000). The NDF values were 50% below of that reported by Balakhial et al. (2008) in canola silage (Hyola 308 variety). Kincaid et al. (2012) reported a lower amount of NDF (29.82%) which can be attributed to an early harvest (70 days after sowing). The CS-0 showed higher IVDDM (P<0.05), similar response was reported by Balakhial et al. (2008) and Kincaid et al. (2012). Although CS-0 showed high NDF content its digestibility was higher than other treatments. According to Bolsen et al. (1996), molasses increases the amount of lactic acid bacteria and improves the NDF degradation of the silages, however we did not observe the later and an improvement in the IVDOM was

achieved in CS-1. Rich diets in α -linolenic acid (C18:3c9c12c15) have shown to increase the concentration of vaccenic acid (C18:1t11) and rumenic acid (C18:2c9t11) in ruminal fluid or milk and meat, these are reported as the main isomers of conjugated linoleic acid. Both acids are biohydrogenation intermediates of linoleic acid (C18: 2 c9c12) in the rumen, after an isomerization, rumenic acid is subsequently reduced to vaccenic acid and again reduced to stearic acid that is the final product of the process (Harfoot and Hazlewood, 1997). Linolenic acid during its hydrogenation does not produce rumenic acid but vaccenic acid in the rumen which acts as substrate for the *de novo* synthesis of rumenic acid in the mammary gland by the action of the enzyme $\Delta 9$ desaturase (Bauman et al. 1999; Sun and Gibbs 2012); *de novo* synthesis represents 70% of the total rumenic acid present in the fat of meat or milk (Bauman et al., 2001); for this reason it is preponderant to boost the production of vaccenic in rumen because the ruminant does not synthesize unsaturated fatty acids with more than 18 carbon atoms, the long-chain fatty acids must be ingested with the diet (Elgersma et al. 2006) and canola silage, besides being a good source of protein, provides a high α -linolenic (C18:3) content that ruminal bacteria degrade to produce vaccenic acid.

The CS-4 treatment improved the DM content by 9% and showed high content of linolenic acid methyl ester (C18:3n3) which is precursor of conjugated linolenic acid in rumen; moreover, the *in vitro* methane production was 32% and 7% lower than CS-2 and CS-0, respectively at 24 hours post-incubation.

Acknowledgments

Authors express their gratitude to the Universidad Autónoma del Estado de México for the financial support within the project (4372/2017/CI) “Producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados y metano del forraje de canola para la alimentación de rumiantes”. This work was carried out within the project: “Estrategias de alimentación basadas en forrajes de calidad y su efecto en la composición de ácidos grasos en leche de rumiantes” (UAM-PTC-490, DSA/103.5/14/11131) and within the project “Desarrollo de modelos de optimización para mitigar los gases de efecto invernadero provenientes de las explotaciones ganaderas”, project number 247825 funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

Authors express their gratitude also for the grant provided to Daniel Limón-Hernández by CONACyT.

References

- Alexander, J. W., 1998. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. *Nutrition* 14:627-633.
- AOAC, 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. AOAC: International, USA. pp: 34-36.
- Balakhial, A., Naserian, A. A., Heravi, M. A., Eftekhari, S. F. and Vali, Z. R., 2008. "Changes in Chemical Composition and *In vitro* DM Digestibility of Urea and Molasses Treated Whole Crop Canola Silage", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(9): 1042–1044, ISSN: 1680-5593, 1993-601X.
- Barry, T. N., 2013. The feeding value of forage brassica plants for grazing ruminant livestock, *Animal Feed Science and Technology*, 181, 15-25
- Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., Griinari, J. M., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants, *Proceedings of the American Society of Animal Science*, pp:1-15.
- Bauman, D. E., Corl, B. A., Baumgard, L. H., Griinari, J. M., 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition 2001*. Nottingham. University Press, Nottingham, UK, pp. 221–250.
- Baytok, E., Aksu, T., Karşlı, M. A., Muruz, H., 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep, *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, 29: 469-474.
- Bolsen, K. K., G. Ashbell and Weinberg, Z., 1996. Silage fermentation and silage additives, *Asian-Australasian Journal Animal Sciences*, 9: 483- 491.
- Broderick, G. A., Kang, J. H., 1980. Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media, *Journal of Dairy Science*, **63**, 64-75.
- Bye, R., Linares E., 2000. Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre el intercambio cultural. *CONABIO. Biodiversitas* 31,11-14.
- Cruz, C. J. J., Núñez, H. G., Faz, C. R., Reta, S. D. G., Serrato, M. H. A., 2012. Potencial forrajero y eficiencia de uso del agua de canola (*Brassica napus* L.) en comparación con cultivos tradicionales en el ciclo de invierno, *Agrofaz* 12:125-130.
- Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G., 2006. Modifying milk composition through forage, *Animal Feed Science and Technology*, 131: 207-225.
- Fales, S. L., Gustine, D. L., Bosworth, S. C., Hoover, R. J. 1987., Concentrations of glucosinolates and S-methylcysteine sulfoxide in ensiled rape (*Brassica napus* L.), *Journal of Dairy Science*, 70, 2402-2405

- Hall, M. H., and Jung, J., 2008. Use of brassica crops to extend the grazing season. Pennsylvania State University Agricultural Cooperative Extension. Agronomy Fact 33. Available at <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/uc100.pdf> (access august, 2017).
- Harfoot, C. G. and Hazlewood, G. P., 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: The Rumen Microbial Ecosystem. PN Hobson (Ed). London, UK, Elsevier. 382-426.
- Jessop, N. S. and Herrero, M., 1996. Influence of soluble components on parameter estimation using the *in vitro* gas production technique, *Animal Science*, 62: 626-627.
- Kincaid, R. L., Johnson, K. A., Michal, J. J., Huisman, A. C., Hulbert, S. H., Pan, W. L., 2012. Case study: production of silage containing biennial canola and peas for use as forage in a dairy ration, *The Professional Animal Scientist*, 28, 120–124.
- NRC. National Research Council 2000. The nutrient requirements of Dairy cattle. 6th ed. Washington, DC, USA: National Academy Press.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C., 2003. Challenges with fast and fatty acid methods. *Journal Animal Science*, 81: 3250-3254.
- Pell, A. N., Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*, *Journal of Dairy Science*, 76:1063-1073
- Reta, S. D. G., Serrato, C. J. S., Quiroga, G. H. M., Gaytán, M. A., Figueroa, V. U., 2015. Forage yield and chemical composition of canola (*Brassica napus* L.) as affected by sowing methods, *Grass Forage Science*, 71 (2), 281–290.
- Suárez, R., Mejía, J., González, M., García, D. E., Perdomo, D. A., 2011. Evaluación de ensilajes mixtos de *Saccharum officinarum* y *Gliricidia sepium* con la utilización de aditivos, *Pastos y Forrajes*, 34:1.
- Sun, X. Q. and Gibbs, 2012. Diurnal variation in fatty acid profiles in rumen digesta from dairy cows grazing high-quality pasture, *Animal. Feed Science and Technology*, 177: 152-160.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., France, J. A., 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.
- Van Soest P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Ithaca, NY; Comstock, Cornell University Press.

Williams, S. R. O., Moate, P. J., Deighton, M. H., Hannah, M. C., Wales, W. J., Jacobs, J. L., 2016. Milk production and composition, methane emissions from dairy cows fed Lucerne hay with forage brassica or chicory, *Animal Production Science*, 56, 304–311.

*Producción in vitro de intermediarios de la biohidrogenación del ensilado de canola
(Brassica napus) en sustitución del ensilado de maíz*

Table 1. Chemical composition (g/ kg DM) and fatty acids profile of canola silage with different levels of molasses

Item [†]	Treatment					SEM [‡]	P
	CS-0	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4		
DM	185 ^a	189 ^a	194 ^b	200 ^b	202 ^b	2.3	0.000
OM	900 ^a	897 ^b	895 ^b	894 ^{bc}	892 ^c	0.5	0.000
CP	147 ^a	147 ^a	147 ^a	141 ^b	143 ^b	1.2	0.001
NDF	399 ^a	388 ^b	377 ^c	371 ^c	365 ^d	2.5	0.011
ADF	206	205	200	205	206	3.6	0.795
GE (Mcal/ kg DM)	4.1 ^a	4.0 ^b	4.0 ^b	4.0 ^b	4.1 ^a	0.02	0.000
pH	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.2	0.841
Fatty acid							
(g/100gFA) ^α							
C12:0	2	2	1	1	2		
C14:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3		
C16:0	21	21	21	22	21		
C16:1	0.5	0.6	0.4	0.4	0.6		
C18:0	3	3	3	3	3		
C18:1n9c	6	4	5	5	6		
C18:2n6c	10	11	10	11	11		
C18:3n3	37	36	35	32	36		
≥ C:20	21	22	24	25	21		

Mean values in the same row with different superscripts are statistically different (P< 0.05)

[†]DM dry matter, OM organic matter, CP, crude protein, NDF, neutral detergent fibre, ADF acid detergent fibre, GE, gross energy, pH, hydrogen potential, P, p-value.

[‡] SEM: standard error of the mean.

^α C12:0 lauric acid, C14:0 myristic acid, C16:0 palmitic acid, C16:1 palmitoleic acid, C18:0 stearic acid, C18:1 oleic acid, C18:2 linoleic acid, C18:3 linolenic acid.

*Producción in vitro de intermediarios de la biohidrogenación del ensilado de canola
(Brassica napus) en sustitución del ensilado de maíz*

Table 2. Fermentation parameters of canola silage with different levels of molasses when the accumulated gas production data were adjusted to the model of Jessop and Herrero (1996)

Item [†]	Treatment					SEM [‡]	P
	CS-0	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4		
PG96 (ml)	132	134	134	133	137	6.3	0.912
A (ml)	34	37	36	37	36	3.3	0.747
c _{-a} (h)	0.15	0.14	0.11	0.15	0.15	0.04	0.650
B (ml)	105	102	103	101	103	4.2	0.747
c _{-b} (h)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.146
Lag (h)	3.5	3.6	3.5	3.4	3.4	0.5	0.997

[†]PG96 accumulated gas production at 96 hours, A gas produced from quickly degradable carbohydrates, c_{-a} rate of gas produced from quickly degradable carbohydrates, B, gas produced from insoluble fraction, c_{-b} rate of gas produced from insoluble fraction, Lag, time (hours) before fermentation of insoluble fraction begins, P p-value. [‡]SEM: standard error of the mean;

Table 3. In vitro digestibility (g/ kg DM) at 48 hours of canola silage with different levels of molasses

Item [†]	Treatment					SEM [‡]	P
	CS-0	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4		
IVDDM	777 ^a	755 ^b	751 ^b	746 ^b	757 ^b	6.3	0.022
IVDOM	697	703	692	686	696	3.9	0.058
IVDNDF	618 ^a	616 ^a	607 ^b	602 ^b	603 ^b	3.6	0.011

Mean values in the same row with different superscripts are statistically different (P< 0.05)

[†]IVDDM *in vitro* digestibility of dry matter, IVDOM *in vitro* digestibility of organic matter, IVDNDF *in vitro* digestibility of neutral detergent fibre, P p-value.

[‡] SEM: standard error of the mean.

Table 4. Ammoniacal nitrogen (mg/ dL) and in vitro accumulated methane production (g/ kg DM) of canola silages with different levels of molasses

	Treatment					SEM [‡]	P
	CS-0	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4		
NH ₃ -N [†]	26 ^a	28 ^a	32 ^b	37 ^c	41 ^d	4.1	0.000
CH ₄ 24h	4.1	5.0	5.6	3.8	3.8	1.9	0.266
CH ₄ 48h	10	11	11	9	10	2.5	0.613

Mean values in the same row with different superscripts are statistically different (P< 0.05)

[†]NH₃-N ammoniacal nitrogen at 72 hours post-incubation, CH₄ 24h methane at 24 hours, CH₄ 48h methane at 48 hours post-incubation, P: p-value.

[‡] SEM: standard error of the mean;

Table 5. Pearson correlation analysis of chemical composition, fermentation parameters, in vitro digestibility and the fatty acid profile of canola silage with different levels of molasses

	Chemical composition					<i>In vitro</i> gas production and digestibility						Fatty acids	
	DM	OM	NDF	ADF	GE	GP96	A	c _a	B	c _b	IVDADF	C16:0	C16:1
B							-0.96**						
DM										0.94*			
NDF	-0.98**	0.99**									-0.87*		
ADF								0.95*					
IVDDM							-0.92*		0.91*				
IVDADF	-0.97**	0.92*	0.96**										
C12:0				0.89*									
C14:0						0.90*							
C18:1n9c					0.96*		-0.89*						
C18:3n3												-0.93*	
≥ C:20													-0.92*
NH ₃ -N	0.99**	-0.94*	-0.96**							0.98**	-0.94*		
CH ₄ 24								-0.93*					

Acronyms as in Tables 1, 2, 3, 4 and 5; *: p-value (P<0.05); **: p-value (P<0.01)

*Producción in vitro de intermediarios de la biohidrogenación del ensilado de canola
(Brassica napus) en sustitución del ensilado de maíz*

Table 6. Linear regression models to estimate fatty acids, in vitro methane production and ammoniacal nitrogen of the canola silage with molasses

	Constant	<i>P</i>	Slope	Predictor	<i>P</i>	R ²
Oleic acid =	- 46.7	0.015	+ 12.8	GE	0.011	0.91
Linolenic acid =	+ 76.6	0.004	- 1.96	PalAc	0.021	0.87
Myristic acid =	- 3.12	0.042	+ 0.025	GP96	0.035	0.82
NH ₃ -N =	-53.91	0.017	+2812	c _{-b}	0.004	0.95
CH ₄ 24 =	+9.89	0.004	-39.3	c _{-a}	0.022	0.86

Oleic, Linolenic, Myristic acids (g/100g FA); GE, GP96, c_{-a}, c_{-b}, NH₃-N, CH₄ 24h, as in Tables 1, 2, 4;

PalAc (g/100g AG): palmitic acid; *P*: p-value

7.2. Digestibilidad, parámetros de fermentación ruminal, metano y producción *in vitro* de intermediarios de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados del ensilado de canola (*Brassica napus*) en sustitución del ensilado de maíz.

La composición química y perfil lipídico de ensilado de maíz en combinación con diferentes niveles de ensilado de canola se muestran en el Cuadro 3.

Disminuyó ($P<0.05$) la materia seca al aumentar la inclusión de ensilado de canola, ya que esta contiene alta humedad, lo cual podría limitar el consumo o presentar problemas de ensilabilidad. Similar patrón se observó en el contenido de proteína bruta. La canola al tratarse de una leguminosa posee niveles altos de proteína, Espinoza- Canales *et al.* (2016) reporta 26.3 % de proteína en forraje de canola cosechado en floración temprana.

No hubo diferencias ($P>0.05$) en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y la materia orgánica, sin embargo si lo hubo para la digestibilidad de la fibra neutro detergente, que de manera lineal descendió a medida que se aumentó el nivel ensilado de canola (Cuadro 3), esto a pesar de que tratamientos con mayor cantidad de ensilado de maíz, tienen niveles más altos de fibra detergente neutro, lo cual nos indica que la fibra del ensilado de maíz es de mayor calidad en comparación con la del ensilado de canola, traduciéndose en una mayor digestibilidad. Espinoza-Canales *et al.* (2016) reportan una disminución de la digestibilidad hasta en un 17% en forraje de canola en floración tardía en comparación con la cosecha en floración temprana, además de un aumento cercano al 100% de la fibra detergente ácido en una cosecha temprana (27.83) vs cosecha tardía (52.06); con esto se podría recomendar que se evite ofrecer el forraje de canola a los animales en un periodo de madurez alto, ya que se estará sacrificando la digestibilidad de la fibra.

Se observa que el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico disminuyen con la inclusión del ensilado de canola, mientras el contenido de ácido linolénico aumenta (Cuadro 3). Es sabido que el ensilado de maíz aporta principalmente ácido linoleico (Dhiman *et al.*, 1999) y el ensilado de canola mayor cantidad de ácido linolénico (Williams *et al.*, 2016).

Cuadro 3. Composición química (g/kg MS), digestibilidad *in vitro* (g/kg MS) y perfil de ácidos grasos (g/100g AG) de mezclas de ensilado de canola con ensilado de maíz.

Componente	Tratamiento ¹					EEM	P<
	100:00	80:20	60:40	40:60	20:80		
Materia seca	266 ^a	253 ^{ab}	240 ^{abc}	226 ^{bc}	213 ^c	7.3	0.0012
Materia orgánica	949 ^a	939 ^b	930 ^c	917 ^d	905 ^e	0.60	<0.0001
Proteína cruda	48 ^e	64 ^d	80 ^c	104 ^b	121 ^a	2.2	<0.0001
Fibra detergente neutro	592 ^a	546 ^b	504 ^c	463 ^d	419 ^e	4.5	<0.0001
Fibra detergente ácido	206	229	228	213	204	5.4	0.017
Energía bruta Mcal/kg MS	4.2	4.1	4.1	4.0	4.0	0.04	0.53
DIVMS ²	770	792	795	800	795	8.1	0.13
DIVMO	700	719	715	716	711	4.5	0.07
DIVFDN	675 ^a	655 ^{ab}	617 ^{bc}	582 ^{cd}	539 ^d	10.3	<0.0001
Ácidos grasos							
C12:0	0.35	0.28	0.50	0.39	0.46		
C14:0	0.59	0.68	0.30	0.48	0.32		
C16:0	19.21	20.15	20.46	18.01	18.08		
C16:1	0.21	0.53	0.47	0.38	0.45		
C18:0	2.44	2.62	2.28	2.35	3.47		
C18:1n9c	25.5	23.15	18.93	14.30	11.74		
C18:2n6c	41.50	35.08	29.63	22.90	16.54		
C18:3n3	7.65	13.78	19.35	28.42	31.60		
C22:0	0	2.93	7.16	12.08	16.64		
Otros	2.55	0.80	0.92	0.69	0.70		

¹Tratamientos, asociación de ensilado de maíz (EM):ensilado de canola (EC); 100:00 = 100%EM:0%EC; 80:20 = 80%EM:20%EC; 60:40 = 60%EM:40%EC; 40:60 = 40%EM:60%EC; 20:80 = 20%EM:80%EC.

² DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca, DIVMO = digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, DIVFDN = digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutro.

³EEM=Error estándar de la media.

^{abc} Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$)

Las mezclas de ensilados de maíz y canola no influyeron en la producción total de gas, así como las fracciones y el tiempo transcurrido antes de que empiece la fermentación de la fracción insoluble, no mostrando diferencias significativas (cuadro 4), por lo que se asume que el proceso de fermentación entre ambos es muy similar.

La producción de nitrógeno amoniacal (NH₃) a las 72 horas post incubación no registrando diferencias significativas (Cuadro 4). El alimento en el rumen sufre diversos cambios, la mayor parte de la proteína se degrada hasta péptidos por acción de las proteasas. Los péptidos se catabolizan a aminoácidos libres, y éstos hasta amoníaco, ácidos grasos volátiles y dióxido de carbono.

Cuadro 4. Parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y nitrógeno amoniacal de mezclas de ensilado de canola con ensilado de maíz.

Variable ¹	Tratamientos ²					EEM ³	P<
	EM	80-20	60-40	40-60	20-80		
PG 96 (ml)	132.02	134.42	133.95	133.24	136.78	6.28	0.9125
A (ml)	33.66	36.7	36.05	36.66	36.36	3.29	0.7475
c _a (/h)	0.1459	13.68	0.1049	0.1512	0.1475	0.04	0.6500
B (ml)	104.96	101.47	102.97	100.67	102.88	4.2	0.7478
c _b (/h)	0.0291	0.0290	0.0302	0.0316	0.0336	0.004	0.1466
Lag (h)	3.49	3.57	3.45	3.44	3.44	0.51	0.9972
NH ₃ -N [†]	47.06	43.09	42.72	44.72	44.28	1.69	0.41

¹PG96 producción de gas acumulado a las 96 horas, gas producido a partir de carbohidratos rápidamente degradables, c_a tasa de gas producido a partir de hidratos de carbono rápidamente degradables, B, gas producido a partir de fracción insoluble, c_b tasa de gas producido a partir de fracción insoluble, Lag, tiempo (horas) antes de que comience la fermentación de la fracción insoluble (Jessop y Herrero, 1996)

²Tratamientos, asociación de ensilado de maíz (EM): ensilado de canola (EC); 100:00 = 100%EM:0%EC; 80:20 = 80%EM:20%EC; 60:40 = 60%EM:40%EC; 40:60 = 40%EM:60%EC; 20:80 = 20%EM:80%EC.

³EEM=Error estándar de la media.

[†] NH₃-N nitrógeno amoniacal (mg/ dL) a las 72 horas post-incubación.

El amoníaco es utilizado por los microorganismos ruminales si existe suficiente energía para la síntesis de proteínas Parte del amoníaco liberado en el rumen no puede ser aprovechado por los microorganismos, entonces se absorbe y a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde se transforma en urea y posteriormente excretada en la orina (Bondi, 1988).

El Cuadro 5 muestra los resultados del perfil de ácidos grasos por efecto de la interacción mezcla de ensilados o sustrato con el tiempo de incubación. A excepción de los ácidos C8:0 y C14:0, el resto mostró diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos (g/100g AG) en mezclas de forraje con distinta proporción de ensilado de maíz y ensilado de canola en distintos tiempos de incubación *in vitro*

Tratamiento ¹	Hora	Ácido graso ²					
		C4:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0
100:00	6	1.50 ^{ab}	8.21 ^a	8.48 ^a	5.52 ^a	3.22 ^a	19.87 ^{bc}
	9	1.65 ^a	7.03 ^b	5.42 ^{cd}	2.86 ^b	2.05 ^{ab}	21.18 ^{bc}
	12	1.48 ^{ab}	6.47 ^c	5.72 ^c	3.20 ^b	1.93 ^{ab}	18.84 ^c
80:20	6	1.79 ^a	0.45 ^e	0.48 ^g	0.67 ^c	1.35 ^b	26.65 ^a
	9	1.19 ^{ab}	0.46 ^e	1.43 ^f	0.99 ^c	0.87 ^b	23.85 ^{ab}
	12	1.64 ^{ab}	0.42 ^e	7.23 ^b	1.45 ^c	1.53 ^b	22.49 ^{bc}
60:40	6	1.59 ^{ab}	0.46 ^d	5.40 ^{cd}	3.16 ^b	2.28 ^{ab}	19.37 ^c
	9	1.29 ^{ab}	1.26 ^e	6.15 ^c	3.09 ^b	3.10 ^a	15.88 ^d
	12	0.99 ^{ab}	1.12 ^{de}	4.68 ^d	2.97 ^b	2.28 ^{ab}	19.61 ^c
40:60	6	1.31 ^{ab}	1.19 ^d	2.67 ^e	2.49 ^{bc}	1.25 ^b	20.33 ^{bc}
	9	1.05 ^{ab}	0.31 ^e	2.49 ^e	1.48 ^c	2.35 ^{ab}	22.54 ^{bc}
	12	0.98 ^b	0.91 ^{de}	3.75 ^c	2.96 ^b	2.23 ^{ab}	24.33 ^{ab}
20:80	6	0.98 ^b	0.56 ^e	1.57 ^f	1.00 ^c	2.40 ^{ab}	25.31 ^{ab}
	9	0.79 ^b	0.65 ^e	2.53 ^e	1.69 ^c	2.19 ^{ab}	23.13 ^b
	12	0.78 ^b	1.22 ^d	2.55 ^e	2.51 ^{bc}	2.30 ^{ab}	24.16 ^{ab}
EEM ³		0.232	0.188	0.309	0.443	0.461	1.147
<i>P</i>		0.757	0.0001	0.0001	0.0017	0.2267	0.0397

¹ Tratamientos, asociación de ensilado de maíz (EM):ensilado de canola (EC); 100:00 = 100%EM:0%EC; 80:20 = 80%EM:20%EC; 60:40 = 60%EM:40%EC; 40:60 = 40%EM:60%EC; 20:80 = 20%EM:80%EC.

² C4:0 ácido butírico, C8:0 ácido caprílico, C10:0 ácido caproico, C12:0 ácido laúrico, C14:0 ácido mirístico, C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico, C18:1c9 ácido oleico, C18:2c9c12 ácido linoleico, C18:3c9-12-15 ácido linolenico, CLA ácido linoleico conjugado. ³EEM=Error estándar de la media.

^{abc} Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$)

Dado el tema central de esta investigación, los intermediarios de la biohidrogenación (BH) de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico), es preciso recalcar el conocimiento del proceso de BH, ya que es un punto crítico para modificar la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados en el producto animal final, la leche y la carne.

Después de la ingestión del alimento, los lípidos esterificados de la dieta son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol, así como también a pequeñas cantidades de mono y diacilgliceridos, por las lipasas microbiales (Jenkins, 1993). Por lo tanto, la lipólisis constituye un paso obligado antes de la BH y las bacterias son las principales responsables del proceso de BH, aunque los hongos y los protozoos pueden participar en la biohidrogenación (Harfoot y Hazlewood, 1997; Yañez-Ruiz *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2007; Buccioni *et al.*, 2012).

El proceso de BH involucra varios pasos bioquímicos, con velocidades, intermediarios y especies bacteriales características (Bauman *et al.*, 1999). La BH es una reducción del número de dobles enlaces sobre la cadena de carbonos del ácido graso (Buccioni *et al.*, 2012).

En el rumen, el ácido ruménico es resultado primeramente de la isómerización del ácido linoleico durante el primer paso del proceso de BH (Kepler y Tove, 1967; Harfoot y Hazlewood, 1997) y posterior reducción de los dobles enlaces de los carbonos 9 y 11 para producir ácido vaccénico y esteárico, respectivamente, como productos finales (Polan *et al.*, 1964). El ácido linolénico de la dieta también sufre el proceso de BH mediante una primera isomerización a un trieno conjugado (C18:3 cis-9 cis-11 cis-15), seguido por reducciones de los dobles enlaces en los carbonos 9, 15 y 11 para producir C18:2 trans-11 cis-15, ácido vaccénico y esteárico, respectivamente (Wilde y Dawson, 1966). La biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico también puede resultar en una producción variable de isómeros trans C18:1 (con dobles enlaces en las posiciones 9, 10 y 12), e isómeros cis C18:1 (con dobles enlaces en la posición 9, 12, y 15) (Kemp *et al.*, 1975). Por lo tanto, el ácido linoleico es precursor directo del ácido ruménico y vaccénico en el rumen, mientras que el ácido linolénico es un precursor de ácido vaccénico pero no de ruménico (Harfoot y Hazelwood, 1997).

En la continuación del Cuadro 5 se observa un mayor incremento de C18:0 a las 9h de incubación en casi todos los tratamientos y después un descenso hacia las 12h. El menor ($P<0.05$) contenido de C18:0 lo mostró el sustrato solo con ensilado de maíz (100:00), muy cerca de él estuvieron los tratamientos con 60 y 80% de ensilado de canola. La producción de ácido esteárico incrementa al completarse el proceso de BH de los PUFA, al ser este el producto final de ambos ácidos linoleico y linolénico (Hartfoot y Hazelwood, 1997).

...continuación Cuadro 5.

Tratamiento ¹	hora	Ácido graso ²					
		C18:0	VACC	C18:1c9	C18:2c9c12	C18:3c9-12-15	CLA
100:00	6	30.01 ^c	2.55 ^e	4.86 ^b	3.88 ^{bc}	0.28 ^f	2.50 ^a
	9	37.50 ^b	4.21 ^d	4.98 ^b	3.86 ^{bc}	0.33 ^f	1.32 ^{bc}
	12	36.03 ^{bc}	9.75 ^a	3.85 ^{bc}	3.25 ^{cd}	0.23 ^f	1.32 ^{bc}
80:20	6	32.05 ^c	6.44 ^{bc}	5.16 ^b	4.11 ^b	0.25 ^f	1.70 ^b
	9	32.50 ^c	6.49 ^{bc}	5.92 ^{ab}	4.84 ^a	0.35 ^f	2.43 ^a
	12	43.50 ^a	7.16 ^b	1.76 ^c	4.08 ^b	1.86 ^d	1.61 ^b
60:40	6	34.79 ^{bc}	5.71 ^{bc}	6.72 ^a	4.67 ^{ab}	0.23 ^f	1.36 ^{bc}
	9	36.55 ^{bc}	5.58 ^{cd}	6.29 ^{ab}	3.29 ^c	0.20 ^f	1.97 ^{ab}
	12	36.07 ^{bc}	6.02 ^{bc}	5.34 ^{ab}	3.85 ^{bc}	0.30 ^f	1.42 ^{bc}
40:60	6	32.81 ^{bc}	3.61 ^{de}	4.44 ^b	1.06 ^e	1.02 ^e	2.56 ^a
	9	43.25 ^a	6.46 ^{bc}	2.11 ^c	2.80 ^{cd}	2.37 ^c	0.57 ^c
	12	42.57 ^a	5.91 ^{bc}	2.17 ^c	2.58 ^{cd}	1.38 ^{de}	1.15 ^{bc}
20:80	6	34.20 ^{bc}	5.76 ^{bc}	3.89 ^{bc}	4.04 ^b	3.66 ^b	0.36 ^c
	9	42.58 ^a	6.44 ^{bc}	1.50 ^c	2.32 ^d	4.34 ^a	0.77 ^c
	12	40.50 ^{ab}	6.21 ^{bc}	2.44 ^c	2.55 ^d	3.39 ^b	0.96 ^c
EEM ³		1.708	0.501	0.532	0.252	0.167	0.213
<i>P</i>		0.0040	<0.0001	0.0029	<0.0001	<0.0001	<0.0001

¹ Tratamientos, asociación de ensilado de maíz (EM):ensilado de canola (EC); 100:00 = 100%EM:0%EC; 80:20 = 80%EM:20%EC; 60:40 = 60%EM:40%EC; 40:60 = 40%EM:60%EC; 20:80 = 20%EM:80%EC.

² C4:0 ácido butírico, C8:0 ácido caprílico, C10:0 ácido caproico, C12:0 ácido laúrico, C14:0 ácido mirístico, C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico, C18:1c9 ácido oleico, C18:2c9c12 ácido linoleico, C18:3c9-12-15 ácido linolenico, CLA ácido linoleico conjugado. ³ EEM=Error estándar de la media.

^{abc} Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$)

En este sentido, los tratamientos 80:20 y 40:60 representaron la mayor producción de C18:0 entre las 9 y 12h de incubación, lo cual podría indicar que, independientemente de la diferencia en el aporte de C18:2 y C18:3 con el forraje incubado, derivado de la proporción de ensilado de maíz y ensilado de canola, respectivamente; no se observó un

patrón claro de la presencia de C18:0 por la BH completa de alguno de los dos ácidos grasos poliinsaturados dada su distinta y marcada diferencia en su aporte con el sustrato, de hecho, los tratamientos 80:20 y 40:60 habrían aportado de C18:2 y C18:3, 35.0 y 13.7; y de 22.9 y 28.4 g/100gAG, respectivamente, al principio de la incubación.

Según Kepler y Tove (1967) existe una competencia en la BH de ambos AG, ya que son hidrogenados por la misma bacteria, lo cual podría indicar que la mayor presencia de un AG poliinsaturado podría ser hidrogenado con una mayor tasa y eficiencia por la preferencia de la bacteria. Sin embargo, esto no se aprecia en nuestros resultados.

La concentración de CLA en la mezcla con menos proporción de ensilado de maíz (20:80) fue la más baja independientemente del tiempo de incubación (Cuadro 6). Varios autores afirman que existe una mayor producción de CLA y vaccénico con el aporte de ácido linoleico, como principal ácido graso en el ensilado de maíz, en estudios *in vitro* (Griinari *et al.*, 2000; Troegeler-Meynaider *et al.*, 2003) e *in vivo* (Chouinard *et al.*, 1999; Dhiman *et al.*, 1999; 2000).

El modo de acción para el incremento de CLA y ácido vaccénico ante la presencia de grandes cantidades de ácido linoleico, se puede atribuir a la saturación (Griinari *et al.*, 2000) o inhibición de la actividad isomerasa (Beam *et al.*, 2000), y por otro lado a una posible inhibición de la reductasa (Griinari *et al.*, 1999; Harfoot *et al.*, 1973). En cambio, según Troegeler-Meynaider *et al.* (2006), la alta cantidad de ácido linolénico no conlleva a un incremento de CLA ni de vaccénico en condiciones *in vitro*, no obstante esta respuesta no ocurre en estudios *in vivo* en donde se ha observado un aumento de ambos intermediarios en la grasa de la leche (Dhiman *et al.*, 2000; Lock y Garnsworthy, 2002).

La respuesta en el contenido de ácido linoleico y linolénico parece ser más estable, se observa una disminución ($P<0.05$) de ácido linoleico conforme disminuye la proporción de ensilado de maíz en la mezcla siendo el nivel más bajo hacia las 9 y 12h de incubación. Contrariamente, el contenido de ácido linolénico aumentó conforme se incrementó la proporción de ensilado de canola en la mezcla, así, el máximo nivel de ácido linolénico fue en el tratamiento 20:80 a las 9h, sin embargo a las 6 y 12h disminuyó ($P<0.05$); un mismo patrón se observó en el tratamiento 40:60 (Cuadro 5).

El contenido *in vitro* de ácidos grasos en mezclas de ensilados de maíz y canola se muestra en el Cuadro 7. Se observaron diferencias ($P < 0.05$) por efecto de los tratamientos en el perfil completo de ácidos grasos aunque sin mostrar un patrón o respuesta estable. El tratamiento con 100 % de ensilado de maíz mostró una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta, destacando su alto contenido de C8:0 y C10:0. Los ácidos C12:0 y C14:0 mostraron menor concentración en las incubaciones en el tratamiento 80:20.

Los tratamientos 80:20 y 20:80 mostraron alto contenido de C16:0, mientras que en el tratamiento 60:40 se observó el contenido más bajo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido *in vitro* de ácidos grasos en raciones con distinta proporción de ensilado de maíz y ensilado de canola.

Ac. Graso ²	Tratamiento ¹					EEM ³	P
	100:00	80:20	60:40	40:60	20:80		
C4:0	1.54 ^a	1.54 ^a	1.29 ^{ab}	1.11 ^{ab}	0.85 ^b	0.134	0.0004
C8:0	7.23 ^a	0.44 ^c	0.94 ^b	0.81 ^{bc}	0.81 ^{bc}	0.108	<0.0001
C10:0	6.54 ^a	3.04 ^c	5.41 ^b	2.94 ^{cd}	2.21 ^d	0.178	<0.0001
C12:0	3.86 ^a	1.04 ^d	3.07 ^{ab}	2.31 ^{bc}	1.73 ^{cd}	0.256	<0.0001
C14:0	2.4 ^a	1.25 ^b	2.55 ^a	1.94 ^{ab}	2.29 ^{ab}	0.266	0.0128
C16:0	19.96 ^{cb}	24.33 ^a	18.28 ^c	22.62 ^{ab}	24.20 ^a	0.661	<0.0001
C18:0	34.51 ^b	36.02 ^{ab}	35.80 ^{ab}	39.46 ^a	39.20 ^a	0.973	0.0033
C18:1c9	4.56 ^b	4.28 ^b	6.11 ^a	2.90 ^c	2.61 ^c	0.307	<0.0001
VACC	5.51 ^b	6.70 ^a	5.77 ^{ab}	5.32 ^b	6.16 ^{ab}	0.289	0.0161
CLA	1.71 ^{ab}	1.91 ^a	1.58 ^{ab}	1.40 ^b	0.69 ^c	0.122	<0.0001
C18:2c9c12	3.66 ^b	4.34 ^a	3.94 ^{ab}	2.15 ^d	2.97 ^c	0.145	<0.0001
C18:3c9-12-15	0.28 ^d	0.82 ^c	0.24 ^d	1.59 ^b	3.79 ^a	0.096	<0.0001

¹ Tratamientos, asociación de ensilado de maíz (EM):ensilado de canola (EC); 100:00 = 100%EM:0%EC; 80:20 = 80%EM:20%EC; 60:40 = 60%EM:40%EC; 40:60 = 40%EM:60%EC; 20:80 = 20%EM:80%EC.

² C4:0 ácido butírico, C8:0 ácido caprílico, C10:0 ácido caproico, C12:0 ácido laúrico, C14:0 ácido mirístico, C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico, C18:1c9 ácido oleico, VACC ácido vaccénico, C18:2c9c12 ácido linoleico, C18:3c9-12-15 ácido linolenico, CLA ácido linoleico conjugado. ³ EEM=Error estándar de la media, ^{abc} Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$)

El ácido esteárico incrementó con el ensilado de canola, el mayor contenido se observó con el 60 y 80% de ensilado de canola. El tratamiento con mayor producción de ácido oleico fue 60:40, siendo 2.3 veces mayor con respecto al tratamiento 20:80 el cual mostró la menor producción de este ácido (Cuadro 6).

El ácido vaccénico fue contrastantemente mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos 80:20 y 20:80, lo cual no permite elucidar el papel del ensilado de canola sobre la producción de este intermediario de la hidrogenación de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos linoleico y linolénico (Buccioni *et al.*, 2012); de hecho sin agregar ensilado de canola se produjo la misma cantidad de ácido vaccénico que al incluir 60% de ensilado de canola.

El ácido vaccénico (C18:1 t11) se origina en rumen por la BH del ácido linolénico (C18:3 c9c12c15) cuando el forraje es la única fuente de FA (Sudarshan y Hawke, 1979). De acuerdo a esta teoría se esperaba que al incluir mayor cantidad de ensilado de canola con una concentración superior de C18:3 c9c12c15 que el ensilado de maíz aumentara significativamente la producción de ácido vaccénico, sin embargo esto no sucedió. Esto concuerda con lo observado por Troegeler-Meynaider *et al.* (2006) quienes mencionan que cantidades altas de ácido linolénico no necesariamente producen más ácido vaccénico.

Los valores más altos de CLA se encontraron en el tratamiento 80:20, y al incrementar el ensilado de canola en el sustrato se observó una disminución de CLA. Un patrón similar se observó en la producción de ácido linoleico, siendo el aporte más grande por el tratamiento 80:20.

Las incubaciones mostraron que cuanto más contenido de ácido linolénico se produjo al ir de 0 a 40% de inclusión de ensilado de canola menor contenido de linolénico se observó. La mayor ($P < 0.05$) producción de ácido linolénico se presentó con el nivel de inclusión más alto ensilado de canola (20:80) que fue 58% mayor que el tratamiento más cercano con 60% de ensilado de canola y hasta 92% mayor que el tratamiento sin ensilado de canola.

La sumatoria total de ácidos grasos con 18 átomos de carbono, arroja que el tratamiento con 20% de ensilado de canola (80:20) presenta mayor cantidad de estos y la producción menor es para el tratamiento 100:00 (55.42 vs. 50.23 g/100g AG), esto en contraparte al aporte del sustrato antes de la incubación, es menor ya que el tratamiento 100:00 aportó 77.09 g/100g AG de ácidos grasos de cadena larga y la dieta 80:20 solo 63.35 g/100g AG, lo cual podría indicar una tasa de hidrogenación (BH) más alta con el ensilado de canola.

Diversos autores mencionan que un factor determinante para la biohidrogenación es el pH del rumen (Gerson *et al.*, 1985; Van Nevel y Demeyer, 1996). La disminución de la BH con pH bajo puede asociarse con la disminución de bacterias celulíticas (Wales *et al.*, 2004), las cuales juegan un papel importante en este proceso metabólico; sin embargo, en nuestros tratamientos no se observaron variaciones en el pH, pudiéndose deber a que las dietas estaban conformadas en su totalidad por forrajes y a que se incluyó una solución tampón para mantener estable el pH. Por lo tanto, las variaciones en el perfil de ácidos grasos en los tratamientos no se vieron influenciadas por la variación del pH del inoculo.

Se considera que en rumen solo el 3% del ácido oleico puede ser isomerizado, el resto del ácido oleico que desaparece se considera que es convertido a C18:0 (Troegeler-Meynaider *et al.*, 2006), en este trabajo podemos observar que a la hora 6 la mayoría de este proceso ya ocurrió, posteriormente a la hora 9 y 12 continua desapareciendo el ácido oleico, y a su vez aumenta la producción de ácido esteárico (Cuadro 7). El mismo patrón también es observado en el contenido de CLA.

Cuadro 7. Contenido de ácidos grasos (g/100g AG) en mezclas de forraje de ensilado de maíz y ensilado de canola en distintos tiempos incubaciones *in vitro*.

Ac. Graso ¹	Hora			EEM	P
	6	9	12		
C4:0	1.43	1.19	1.17	0.104	0.194
C8:0	2.18	1.94	2.02	0.084	0.148
C10:0	3.70 ^b	3.6 ^b	4.78 ^a	0.138	<0.0001
C12:0	2.56	2.02	2.61	0.198	0.079
C14:0	2.1	2.11	2.05	0.206	0.980
C16:0	22.44	21.31	21.88	0.513	0.3127
C18:0	32.79 ^b	38.47 ^a	39.73 ^a	0.764	<0.0001
VACC	4.8 ^c	5.85 ^b	7.01 ^a	0.224	<0.0001
CLA	1.68 ^a	1.41 ^{ab}	1.29 ^b	0.095	0.0194
C18:1c9	5.00 ^a	4.16 ^b	3.11 ^c	0.238	<0.0001
C18:2c9c12	3.55	3.42	3.26	0.012	0.2073
C18:3c9-12-15	1.08 ^b	1.51 ^a	1.43 ^a	0.074	0.0008

¹ C4:0 ácido butírico, C8:0 ácido caprílico, C10:0 ácido caproico, C12:0 ácido laúrico, C14:0 ácido mirístico, C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico, C18:1c9 ácido oleico, C18:2c9c12 ácido linoleico, C18:3c9-12-15 ácido linolenico, CLA ácido linoleico conjugado. ³EEM=Error estándar de la media.

^{abc} Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($p \leq 0.05$)

Por efecto del tiempo de incubación, la producción de ácido vaccénico aumentó ($P<0.05$) con el paso del tiempo de incubación, algo similar a lo ocurrido con la producción de ácido linolénico (Cuadro 8). El ácido vaccénico es un intermediario de la BH del ácido linoleico producido en la segunda reacción o reducción del CLA, y es un AG estable en el ambiente ruminal cuya reducción a ácido esteárico puede ser inhibida por distintos factores como la saturación de la reacción, la cantidad de ácido linolénico y el pH (Troegeler-Meynaider *et al.*, 2006).

VIII. CONCLUSIÓN

El forraje de canola puede ser ensilado para utilizarse en la alimentación de rumiantes presentando alta digestibilidad y aporte de nutrientes, así y como una fuente de ácidos grasos polinsaturados, principalmente ácido linolenico. El uso de melaza (4%) como aditivo, mejora el porcentaje de materia seca, fibra detergente neutro y disminuye el pH, el cual es indicativo de una adecuada fermentación.

El ensilado de canola en sustitución del ensilado de maíz, no tiene efecto sobre la producción de gas y digestibilidad *in vitro* de la materia seca; a pesar de ser una fuente importante de ácido linolenico, no necesariamente mejora la producción *in vitro* de ácido vaccenico, precursor para la síntesis *de novo* de ácido linoleico conjugado. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar lo observado en la presente investigación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adogla-Bessa, T., E. Owen, and A. T. Adesogan. 1999. Ensiling of whole crop wheat with cellulase-hemicellulase based enzymes 3. Comparing effects of urea or enzyme treatment on forage composition and stability. *Anim. Fd. Sci. Technol.* 82:51-61.
- Alexander J. W. 1998. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. *Nutrition* 14:627-633.
- Al-Ghobari H. M. 2000. Estimation of reference evapotranspiration for suotherm región of Saudi Arabia. *Irrigation Science.*19:81-86.
- Andrade P. V. D., Schmidely P. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livest Sci*, 104(1):77-90.
- Angulo J, Mahecha L, Olivera M. (2009): Síntesis, composición y modificación de la grasa de la leche bovina: Un nutriente valioso para la salud humana. *MVZ Córdoba*, 14(3):156-158.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. AOAC: International, USA. pp: 34-36.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15(942.05).
- Aragadvay Y. R. G., Rayas A. A. R., Heredia N. D., Estrada F. J. G., Martínez C. F. E. Arriaga J. C. M. 2015. Evaluación *in vitro* del ensilaje de girasol (*Helianthus annuus* L.) solo y combinado con ensilaje de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 6(3), 315-327.
- Aro A., Mannisto S., Salminen I., Ovaskainen M. L., Kataja V., Uusitupa M. 2000. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in post-menopausal women. *Nutr. Cancer*, 38:151–157.
- Balakhial A., Naserian A. A., Heravi M. A., Eftekhar S. F. and Vali Z. R. 2008. “Changes in Chemical Composition and *In vitro* DM Digestibility of Urea and Molasses Treated Whole Crop Canola Silage”. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(9): 1042–104. ISSN: 1680-5593, 1993-601X.
- Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. 2002. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85:2948–2963.
- Barry T.N. 2013. The feeding value of forage brassica plants for grazing ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 181, 15-25
- Bauman D. E., Baumgard L. H., Corl B. A., Griinari J. M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. American Soc. Animal Sci.*, pp:1-15.
- Bauman D. E., Griinari J. M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome: Review. *Livest. Prod. Sci.*, 70:15-29.

- Bauman D. E., Corl B. A., Baumgard L. H., Griinari J. M. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition 2001*. Nottingham. University Press, Nottingham, UK, pp. 221–250.
- Bauman D. E., Mather I. H., Wall RJ, Lock AL. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.*, 89:1235-1243.
- Bauman D. E., Baumgard L. H., Corl B. A., Griinari J. M. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1999.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, K. J. Harvatine, and L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403–409
- Baytok E., Aksu T., Karşlı M.A., Muruz H. 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turk. J. Anim. Sci.* 29: 469-474.
- Beam TM., Jenkins TC., Moate PJ., Kohn RA., Palmquist DL. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 83: 2564–2573.
- Belch, J. J. F., and A. Muir. 1998. n-6 and n-3 essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Proc. Nutr. Soc.* 57:563–569.
- Bell J.M. 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. *Canadian Journal of Animal Science* **73**, 679–697
- Belury M. A. 1995. Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr. Rev.*, 53:83-89.
- Betancourt, M., González I., y Martínez M. 2005. Evaluación de la calidad de los ensilajes. *Revista Digital CENIAP*, Issue 8
- Boadi D. A., Wittenberg K. M., McCaughey W. P. 2002. Effects of grain supplementation on methane production of grazing steers using the sulphur (SF6) tracer gas technique. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 151–157.
- Boadi D., Benchaar C., Chiquette J., Masse D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 319–335.
- Bodas R., Manso T., Mantecón A. R., Juárez M., de la Fuente M. A, Gómez-Cortés P. 2010. Comparison of the fatty acid profiles in cheeses from ewes fed diets supplemented with different plant oils. *J Agric Food Chem*;58(19):10493-10502.
- Bolsen K. K., G. Ashbell and Weinberg, Z. 1996. Silage fermentation and silage additives. *Asian-Australasian Journal Animal Sciences.* 9: 483- 491.
- Bolsen, K. K. y Brent, B. E., 2007. *The Silage Triangle and Important Practices Often Overlooked*. Kansas State University, Courtesy of Alltech Inc.
- Bondi A. A. 1988. *Nutrición animal: Metabolismo proteico de los rumiantes*. pág. 155.

- Boufaïed, H., Chouinard, P.Y., Tremblay, G.F., Petit, H.V., Michaud, R. & Bélanger, G. (2003). Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 501-511.
- Boyles, M., Peeper, T., and Stamm, M. 2009. Great Plains canola production handbook. Kansas Agricultural Experiment Station. Kansas State University. 29 pp.
- Broderick G A, Kang J H. 1980. Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
- Bu D. P, Wang J. Q., Dhiman T. R., Liu S.J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(2):998-1007.
- Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and bio hydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174: 1-25.
- Bye R., Linares E. 2000. Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre el intercambio cultural. *CONABIO. Biodiversitas* 31,11-14.
- Chaudhry, A. S. 1998. Biological and chemical procedures to upgrade cereal straws for ruminants. *Animal Nutrition* 68: 319-331
- Chilliard Y, Ferlay A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Repr. Nutr. Dev.*, 44: 467-492.
- Chilliard Y., A. Ferlay, M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages animal fat marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70: 31-48.
- Cho H. J., Kim W. K., Kim E. J., Jung K. C., Park S., Lee H. S., Tyner A. L, Park J. H. 2003. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 284:G996–1005.
- Chouinard PY. Corneau L. Kelly. ML. Griinari JM. Bauman DE. 1999. Effect of dietary manipulation on milk fatty acids composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129: 1579-1584
- Claridge J.H. 1972. The *Brassicas*. In: *Arable farm crops of New Zealand*. DSIR, A.H. Reed Ltd., Wellington, New Zealand. pp. 181-224.
- Collomb M., Sollberger H., Bütikofer U., Sieber R., Stoll W., Schaeren W. 2004. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy*;14(6):549-559.
- Cruz C.J.J., G., Núñez H.R., Faz C., D. G. Reta S. y H. A., Serrato M. 2012. Potencial forrajero y eficiencia de uso del agua de canola (*Brassica napus* L.) en

- comparación con cultivos tradicionales en el ciclo de invierno. *Agrofaz* 12:125-130.
- Dansby, A., C. Pierson., J. Bushong., B. Caldbeck., J. Damicone., C. Godsey., M. Stamm., D. Thorenson., & F. Young. 2011. U. S. Canola digest. An official publication of the U. S. Canola Association. 3 (1) 10:26.
- Demarquilly, C. 1985. Recent changes in silage production. En: Berting, G. (ed.) *Silage new biological aspects* Paris, Sanofi Animal Health. pp. 125-135.
- Demment M. W., Allen L. H. 2004. Animal source foods to improve micronutrient nutrition and human function in developing countries. *J. Nutr.*, 133 (Suppl.): 11-S II.
- Dewhurst, R. J. y King, P. J. 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass and Forage Science* 53, 219-224.
- Dhiman T. R., Anand G.R., Satter L. D., Pariza M.W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82:2146-2156.
- Dhiman TR., Satter LD., Pariza MW., Galli MP., Albright K., Tolosa MX. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows pffered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83: 1016-1027.
- Doré, J., y Gouet, P. 1991. Microbial interactions in the rumen. *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris, France, 71-88.
- Eastridge M.L., Firkins J.L. 1991. Feeding Hydrogenated Fatty Acids and Triglycerides to Lacting Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 74:2610-2616
- Elferink, S. J. W., Driehuis, F., Gottschal, J. C. y Spoelstra, S., 1999. Silage fermentation processes and their manipulation. [En línea]Available at: <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/gricult/agp/agpc/gp/silage/contents>.
- Elgersma A. Ellen G. Dekker PR. Van der. Horst. Muuse BG. Boer H. Tamminga S (2004).” Quick changes in milk fat composition after transition from fresh grass to a silage diet and effects on consumer health benefits” *Anim. Feed Sci Thech.* 117: 13-27.
- Elgersma, A., S. Tamminga, and G. Ellen. 2006. Review: Modifying milk composition through forage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:207–225.
- Elizondo L.R., Elizondo, M.R. y Ortega, S.A. 1996. *Ganadería: Guía para la reproducción, nutrición y mejora del ganado (Tomo VI)*.Mc Graw-Hill. S.A. de C.V. México, D.F.
- Estrada, F. J. G. 2005. Caracterización nutricional de maíz y arvenses utilizados en la alimentación del ganado en sistemas campesinos en dos zonas contrastantes del Estado de México. Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

- Fales S. L., Gustine D. L., Bosworth S. C., Hoover R. J. 1987. Concentrations of glucosinolates and S-methylcysteine sulfoxide in ensiled rape (*Brassica napus* L). *Journal of Dairy Science*. 70, 2402-2405
- Filippi, R. 2011. Conceptos básicos en la elaboración de ensilajes. Universidad de la Frontera. Chile. P.1-95
- Fonty G and K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. pp. 655-679. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (Eds.). Academic Press, San Diego.
- France, J. y R. C. Siddons. 1998. Volatile fatty acid production. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Eds. J.M. Forbes y J. France. CAB International. Cambridge U.K. pp. 107-121.
- French P., Stanton C., Lawless F., O'Riordan E. G., Monahan F. J., Caffrey P. J. & Moloney A.P. 2000. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentratebased diets. *Journal of Animal Science* 78, 2849-2855.
- Gangliostro G. A., Schroeder G. F. 2007. Efectos de la suplementación con sales cálcicas de ácidos grasos insaturados sobre la digestión ruminal en vacas lecheras en pastoreo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 15:85-97.
- Garcés A. M., Berrio L., Ruíz S., Serna J. G., y Builes A. F. 2004. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*. 1:66-71.
- Gerson T., John A., King A. S. D. 1985. The effect of dietary starch and fiber on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *J. Agric. Sci. (Camb)* 105: 27-30.
- Griinari J. M., Bauman D. E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. pp. 180-200. AOCS Press. USA.
- Griinari J.M., Corl B. A., Lacy S. H., Chouinard P. Y., Nurmela K. V. V., Bauman D. E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by delta 9-desaturase. *J. Nutr.* 130: 2285-2291.
- Hall M. H., and Jung J. 2008. Use of brassica crops to extend the grazing season. Pennsylvania State University Agricultural Cooperative Extension. Agronomy Fact 33. Available at <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/uc100.pdf> (acceso agosto 2017).
- Harbige L. S. 1998. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proc. Nutr. Soc.* 57:555-562.
- Harfoot CG. (1978). "Lipid metabolism in the rumen." *Prog. Lipid Res.*: 17:21.
- Harfoot, C.G.; Hazlewood, G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N.; Stewart, C.S. (eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*, ed. Chapman and Hall, London, UK. p. 382-426.

- Harfoot CG., Noble RC., Moore JH. 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganism in vitro. *J. Food Agric.* 24, 961.
- Haro A. M., Artacho R., Cabrera-Vique C. 2006. Ácido linoleico conjugado: interés actual en nutrición humana. *Med Clin (Barc.)*, 127(13):508-515.
- Henderson. N. 1993. Silage additives. *Animal Feed Science and Technology* 45:35-56
- Herrero, M., Dent, J. B., Fawcett R. H. 1998. The plant/animal interface in models of grazing systems. In: Peart, RM and R.B. Curry (eds). *Agricultural Systems Modelling and Simulation*, pp. 495-542. Marcel Dekker, Inc.
- Honig H. y Woolford M. K. 1980. Changes in silage on exposure to air. En: Thomas, C.; editor. *Forage Conservation in the 80s.* (11:1980: Hurley). BGS Occasional Symposium. Hurley: British Grassland Society. p. 76-87.
- Houseknecht K. L., Vanden Heuvel J. P., Moya-Camarena S. Y., Portocarrero C. P., Peck L. W., Nickel K. P., Belury M. A., 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244:678-682.
- Inzunza, I. M. A.; Mendoza, M. S. F.; Catalán, V. E. A.; Villa, C. M. M.; Sánchez, C. I. y Román, L. A. 2007. Productividad del chile jalapeño en condiciones de riego por goteo y acolchado plástico. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:429-436.
- Ip C., Banni S., Angioni E., Carta G., McGinley J., Thompson H. J., Barbano B., Bauman D. E. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butterfat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, 129:2135-2142.
- Jarvis G. N., Strömpl C., Burgess D.M., Skillman L.C., Moore E.R. 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr microbial.* 40 (5): 327-332.
- Jaster, E..1995. Legume and grass silage preservation. In: *Post harvest physiology and preservation of forages.* Ed. by K. J. Moore, M. A. Peterson, D. M. Kral, M. K. Viney. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin USACS SA Special Publication 22 p.91-115.
- Jenkins T. C, Bridges Jr W. C. 2007. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109:778-789.
- Jenkins T. C. 1993. Symposium: advances in ruminant lipid metabolism. *Lipid Metabolism in the Rumen. J. Dairy Sci.*, 76:3851-3863.
- Jenkins T. C. 2004. Challenges of meeting cow demands for omega fatty acids. 15th Florida Ruminant Nutrition Symposium. USA.
- Jessop N. S. y M. Herrero. 1996. Influence of soluble components on parameter estimation using the *in vitro* gas production technique. *Anim. Sci.* 62: 626-627.
- Jiang J. Bjoerck L. Fonden R. Emanuelson M. 1996. Occurrence of conjugated cis-9trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regime. *J. Dairy Sci.* 79: 438-445”
- Johnson, K. A, Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*, 73(8), 2483-2492.

- Jung, H. G., y Allen, M. S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of animal science*, 73(9), 2774-2790.
- Kairenius P., Arola A., Leskinen H., Toivonen V., Ahvenjarvi 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*, 98:5653-5671.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89(1), 124-135.
- Kay J. K., Roche J. R., Kolver E. S., Thomson N. A., Baumgard L. H. 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Dairy Res.*, 73:322-332.
- Kelly M.L., Kolver E. S., Bauman D. E., Van Amburgh M. E., Muller L. D. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81: 1630-1636.
- Kemp P., White R.W., y Lander D.J. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90: 100–114.
- Kepler C.R., y Tove S.B. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: Purification and properties of a linoleate 12 cis - 11trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242: 5686–5692.
- Kincaid R. L., Johnson K. A., Michal J.J., Huisman A. C., Hulbert S.H. and Pan W. L. 2012. Case study: production of silage containing biennial canola and peas for use as forage in a dairy ration. *The Professional Animal Scientist*, 28, 120–124.
- Kinsman, R., Sauer F. D., Jackson H. A., Wolynetz, M. S. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci.* 78 (12): 2760-2766.
- Kolver, E. S., and L. D. Muller. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81:1403–1411.
- Krishnamoorthy, U., H. Soller., H. Steingass y K.H. Menke. 1995. Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 52: 177-188.
- Kung Jr. L and Muck, R E. 1997. Effects of Silage Additives on Ensiling. *Proceedings from the Silage: Field to Feedbunk North American Conference, Hershey, 11-13 February 1997, NRAES-99, 187-199*
- Kurihara, M., Magner, T., McCrabb, H., McCrabb, G. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*, 81(03), 227-234.

- Leaf A., Xiao Y. F., Kang J. X., Billamn G. E. 2003. "Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids." *Pharm. Therapeut* 98: 355-377
- Lima L. S., Santos G. T., Schogor A. B., Damasceno J. C., Marchi F. E, Santos N. W, Santos F. S, Petit H. V. 2014. Effect of abomasal or ruminal supplementation of citrus pulp and soybean oil on nutrient digestibility and ruminal fermentation of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 189:123–129.
- Liu Y. y Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci.* 1125: 171–189.
- Lock AL y Garnsworthy PC. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linoleinic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cow's milk. *Anim. Sci.* 74: 163-176.
- Lock AL., Shingfield KJ. 2004. Optimising milk composition. In: Kebreab E. Mills J. Beever DE (Eds.), *Dairying—Using Science to Meet Consumers' Needs*. Brit. Soc. Anim. Sci. Nottingham University Press, Loughborough, UK.
- Loor J. J., Herbein J. H. 2003. Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 103:63-83.
- McDonald, P., Henderson, A. R. & MacGregor, A. W., 1968. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19(3), pp. 125-132.
- Macfarlane smith W.H., Neppel V.A.F., Wood J., Gill W.D., Walker K.C., 1984. Husbandry practices in forage rape growing. Proc Better *Brassicas* Conference. St. Andrews, Scotland (Macfarlane Smith W.H., Hodgkin T., eds). September. pp. 155-161.
- 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.
- Martínez M. A. L, Pérez H. M., Pérez A. L. M, Carrión P. D., Gómez C. G, Garzón S. A. I. 2013. Efecto de los aceites y semillas en dietas para rumiantes sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 4(3): 319-338.
- McAllister T. A., Cheng K. J., Okine E. K., Mathison G. W. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can J Anim Sci.* 76 (2): 231-243.
- McCaughey, W., Wittenberg, K., Corrigan D. 1997. Methane production by steers on pasture. *Canadian Journal of Animal Science*, 77(3), 519-524.
- McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 2006. *Nutrición Animal*, 6a.ed. Zaragoza, Acribia. 587 p.
- McDonald, P. 1981. *The biochemistry of silage*. Wiley. UK. 226 p.
- McDonald, P., Henderson, N. y Heron, S. 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications.

- Meale S. J., Chaves A. V., Baah J., McAlister T. A., 2012. Methane production of different forages in *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25, 86–91
- Mejía U. L. A., Borquez J. L., Salem A. Z. M., Domínguez V. I. A., González R. M. 2013. Effects of adding different protein and carbohydrates sources on chemical composition and *in vitro* gas production of corn stover silage. *Spanish J Agric Res* 11(2):427–430
- Mendoza A., Cajarville C. y Repetto J. L. 2016. Intake, milk production and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *Journal of Dairy Science* 99, 1938–1944
- Menke K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they *are* incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal Agricultural Science Cambridge* 93:217-222.
- Menke K. H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid *Animal Research and Development* 28: 7–55
- Merchen N. R., Elizalde J. C., Drackley J. K. 1997. Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. *J Anim Sci.* 75:2223-2234.
- Merry R. J., Lowes K. F., y Winters A. 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. p. 17-27.
- Mojica, J.R. 1993. Estandarización del método *Roll Tube* para el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias de rumiantes. Tesis; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. pp. 1-138.
- Morales A, E., Soldado A., Gonzalez A., Martinez-Fernandez A., Dominguez-Vara I., de la Roza-Delgado B. 2010. Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J. Dairy Res.* 77:225-230.
- Moss A. R., Jouany J.P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech.* 49 (3): 231–253.
- Muck R. E. 1988. Factors Influencing Silage Quality and Their Implications for Management. *Journal of Dairy Science*, 71(11), pp. 2992-3002.
- Noble R. C., Moore J.H., Harfoot C.G. 1974. Observations of the pattern of biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *British J. of Nutrition* 31: 99- 108.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Edn. National Academic Press, USA.
- NRC. 2000. The nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Washington, DC, USA: National Academy Press; 2000.
- Ojeda F., Caceres, O., Esperance M. 1991. Estudio 8. Conservación de Forrajes. Roma, Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre, p. 80.

- Ørskov E. R. y McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 92: 499–503.
- Ørskov E.R. 1992. *Protein Nutrition in Ruminants*. 2nd Edition. Academic Press. New York, EUA
- Palmquist D. L. 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cow. *Fat in Animal Nutrition*. pp. 357–381. Editions Bultersworkts. England.
- Palmquist D. L. y T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fast and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81: 3250-3254.
- Palmquist D. L. 1988. The feeding value of fats. In: Ørskov ER. (Ed), *World Animal Science*. pp. 293-311. Elsevier. Amsterdam.
- Palombo J. D., Ganguly A., Bistrián B. R. y Menard M. P. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett*; 177:163-172.
- Parodi P. W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, 82:1339-1349.
- Parodi, P. 2004. Milk fat in human nutrition. *Australian J Dairy Technol.*, 59:3–59.
- Pell A.N. y Schofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 76:1063-1073.
- Polan CE., McNeill JJ., y Tove SB. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88: 1056–1064.
- Posada S. L. y Noguera R. R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Res. Rural Develop* 17:4
- Primavesi O., Shiraishi R.T., Dos Santos M., Aparecida M., Teresinha T., Franklin P. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesq agropec bras.* 39 (3): 277-283.
- Prins R. A. 1991. The rumen ciliates and their functions. In: Jouany J P (editor). *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions. Paris, Cedex. Pp 39-52.
- Relling A. E., Mattioli G. A. 2007. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Reta S. D. G., Figueroa V. U., Serrato C. J. S., Quiroga G. H. M., Gaytán M. A., Cueto W. J. A. 2015. Potencial forrajero y productividad del agua en patrones de cultivo alternativos. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 6(2):153-170.
- Reta S. D. G., Serrato C. J. S., Quiroga G. H. M., Gaytán, M. A., Figueroa V. U. 2015. Forage yield and chemical composition of canola (*Brassica napus* L.) as affected by sowing methods. *Grass Forage Science*. 71 (2), 281–290.

- Ribeiro C. V. M., Eastridge L., Firkins J. L., St-Pierre N. R., Palmquist D. L. 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. J of Dairy Science. 90:1405–1416.
- Rodríguez F. 2005. Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen. Revista Corpoica, 6(1).
- Romero Huelva M. 2012. Uso de bloques multinutrientes de destrios de tomate y pepino como alternativa al concentrado en la dieta de caprino. Efectos sobre la fermentación y microbiota ruminal, la utilización de nutrientes y la producción y composición de la leche.
- Sauvant D. and Bas P. 2001. La digestion des lipides chez le ruminant. INRA Prod. Anim., 14:303-310.
- Sauvant D., Bas P. 2001. La digestion des lipides chez le ruminant. INRA Prod. Anim., 14:303-310.
- Schmid A., Collomb M., Sieber R., Bee G. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. Meat Science, 73:29–41.
- Schroeder G. F., Gagliostro G. A., Bargo F., Delahoy J. E., and Muller L. D. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. Livest. Prod. Sci. 86: 1-18.
- Shimada, A. 2009. Nutrición animal. Importancia e historia de la nutrición. Edi 2da. Trillas. México. pag. 337.
- Silva M. C., Rodrigues M. T., Branco R. H., Rodrigues A. F., Sarmiento L.R., Queiroz A. C., Silva S. P. 2007. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. R. Bras. Zootec., 36:257-264.
- Singh S., Kushwaha B.P., Nag S.K., Mishra A.K., Singh A. 2012 *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. Anim Feed Sci Technol. 178 (1):2-11.
- Sniffen C. J., O'Connor, J. D., Van Soest P. J., Fox D. G., Russell, J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci. 70, 3562–3577.
- Statistical Analysis System (SAS). 2002. Software (V.9.0). User's Guide. N. C., USA. 315 p.
- Sovero M. 1993. Rapeseed, a new oilseed crop for the United States. In: New Crops. J. Janick and J. E. Simon (eds.). Wiley. New York. pp:302-307.
- Stewart C. S. 1991. The rumen bacteria. In: Jouany J P (editor). Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA Editions. Paris, Cedex. Pp 15-26.
- Suárez R., Mejía J., González M., García D. E., Perdomo D. A. 2011. Evaluación de ensilajes mixtos de *Saccharum officinarum* y *Gliricidia sepium* con la utilización de aditivos. Pastos y Forrajes, 34:1.

- Sudarshan, S., and J. C. Hawke. 1979. The *in vitro* lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglyceride by whole rumen contents and its fractions. *J. Sci. Food Agric.* 30:603–612.
- Sukhija P.S., and D.L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agr. Food Chem.* 36: 1202-1206
- Sun X. Q., Gibbs S. J. 2012. Diurnal variation in fatty acid profiles in rumen digesta from dairy cows grazing high-quality pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 177:152-160.
- Sutton J. D., 1989. Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.*, 72:2801-2814.
- Tavendale M. H., Meagher L. P., Pacheco D. Walker N., Attwood G. T. and Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Feed Sci. Technol.* 123:403-419.
- Teuber K. N., Balocchi L.O., Parga M. J. 2007. Manejo del Pastoreo. Imprenta America. Chile.
- Theodorou M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B., France J. A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. *Anim Feed Sci Technol*;48:185-197.
- Tilley J. M. A. y Terry. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104-111.
- Tobia C. R. y Vargas, E. G. 2000. Inóculos bacterianos para mejorar el proceso fermentativo en los ensilajes tropicales. *Nutrición Animal Tropical*, Volumen 6, pp. 129-143.
- Tripathi M. K., Mishra A. S. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: a review. *Animal Feed Science and Technology* **132**, 1–27.
- Troegeler-Meynadier A. Bret-Bennis L y Enjalbert F. 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 713-724.
- Troegeler-Meynadier A. Nicot MC. Bayourthe C. Moncoulon R y Enjalbert F. 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 86: 4054–4063.
- Ueda K., Chabrot J., Doreau M. 2002. Effect of silage and hay making on fatty acid content and composition of legumes. *Grassland Science in Europe* 7, 98-99.
- Ulyatt M.J. y Lassey K. R. 2001. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand. *Arch Latinoam Prod Anim.* 9(1):118-126.
- Vallejo M. A. 1995. Efecto del premarchitado y la adición de melaza sobre la calidad del ensilaje de diferentes follajes de árboles y arbustos tropicales. Turrialba.
- Valsta L.M., Tapanainen H. M. 2005. Meat fats in nutrition- a review. *Meat Sci.* 70: 525-530
- Van Nevel CJ., Demeyer DI. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Repr. Nutr. Dev.* 36(1): 53-63.

- Van Soest P. J. 1994. Nutritional Ecology of the ruminant 2nd. E d. Cornell University Press. 337-353.
- Van Soest P. J., Roberson J. B., Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3897.
- Vibart R. E., Fellner V., Burns J. C., Huntington G. B., and Green Jr J. T. 2008. Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J. Dairy Res.* 75:471-480.
- Wales, W. J., E. S. Kolver, P. L. Thorne, and A. R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* 87:1864-1871.
- Walker G. P., Dunshea F.R., Doyle P. T. 2004. Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 55:1009-1028.
- Warren H. E., Tweed J. K. S., Younell, S. J., Dewhurst, R. J., Lee M. R. F. 2002. Effect of ensiling on the fatty acid composition of the resultant silage. *Grassland Science in Europe* 7, 100-101.
- Weinberg Z. G. and Muck R. G. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:53-68.
- White S. L, Bertrand J. A., Wade M. R., Washburn S. P., Green J. T., Jenkins T. C. 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 84:2295-2301.
- Wijesundera C., Shen Z., Wales W. J., Dalley D. E. 2003. Effect of cereal grain and fibres supplements on the fatty acid composition of milk fat of grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Res.*, 70:257-265.
- Wilde PF., y Dawson RMC. 1966. The biohydrogenation of alpha-linolenic acid and oleic acid by rumen microorganisms. *Biochem. J.* 98: 469-475.
- Williams S. R. O., Moate P. J., Deighton M. H., Hannah M. C., Wales W. J., Jacobs J. L. 2016. Milk production and composition, methane emissions from dairy cows fed Lucerne hay with forage brassica or chicory. *Animal Production Science*. 56, 304-311.
- Williams S.M. 2000. "Dietary fatty acids and human health." *Annales de Zootechnie* 49:165-180
- Woolford M. K. 1984. *The silage fermentation*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Yañez-Ruiz, D.R.; Scollan, N.D.; Merry, R.J.; Newbold, C.J. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Br. J. Nutr.* 96:861-869.

X. ANEXOS

10.1 Resumen enviado a la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Noviembre 2017.

Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Año 3. Vol.1 Núm.1. Noviembre 2017.

COMPOSICIÓN QUÍMICA, DIGESTIBILIDAD Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ENSILADO DE CANOLA (*BRASSICA NAPUS*) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE MELAZA.

CHEMICAL COMPOSITION, FATTY ACID PROFILE AND DIGESTIBILITY OF CANOLA SILAGE (*BRASSICA NAPUS*) WITH DIFFERENT LEVELS OF MOLASSES.

Limón HD¹, García MA², Rayas AAA³, Morales AE¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Centro Universitario UAEM Temascaltepec. Universidad Autónoma del Estado de México, México. ³Departamento de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Lerma, México.

emoralesa@uaemex.mx

Palabras clave: Colza, Ensilado, In vitro.

INTRODUCCIÓN.

En México, la mayoría de las brassicas son destinadas al consumo familiar, de ellas se consumen partes de la planta de manera tradicional (hojas tiernas, tallos tiernos y flores), en otros países el forraje de brassicas es utilizado para la producción ganadera (Williams *et al.*, 2016), sin embargo, en México su siembra y uso en la alimentación animal aun es limitado.

La canola (*Brassica napus*) es un cultivo alternativo en la temporada de invierno con gran potencial forrajero, presenta producciones y un aporte nutricional similar o superior a las gramíneas de grano pequeño, tolera varios tipos de suelos, es de rápido crecimiento, se adapta a condiciones frías y hace un uso eficiente del agua; incluso se ha comparado con alfalfa reportando mayor digestibilidad y niveles similares de nutrientes.

Las brassicas presentan alta digestibilidad de la materia seca (MS) (81 a 89 %) y energía metabolizable (EM) (2.8 a 3.3 Mcal/ kg MS), siendo estos valores más altos que la mayoría de los pastos o leguminosas (Barry, 2013). Es importante mencionar que las plantas del género *Brassica* presentan una elevada concentración de azufre en comparación con otras plantas forrajeras, debido principalmente al aminoácido libre S-metil-cisteína sulfóxido (SMCO) y glucosinolatos, además de presentar altas concentraciones de sulfato inorgánico (Barry, 2013); se ha comprobado que los glucosinolatos tienen propiedades anti-nutricionales, reduciendo el consumo de alimento y la digestibilidad de aminoácidos en los animales; sin embargo estudios han demostrado que el proceso de ensilaje es un método que contribuye a disminuir estos efectos anti nutricionales que posee la canola (Fales *et al.*, 1987), además permite conservar el forraje sin afectar sus características nutricionales ni palatabilidad para que sea utilizado en los períodos del año en donde la falta de agua limita la producción de forrajes.

Un aditivo comúnmente utilizado en el proceso de ensilaje de forrajes es la melaza, la cual es una fuente de energía para los microorganismos productores de ácido láctico, además que puede incrementar el contenido de materia seca del ensilado.

La utilización del forraje de canola es una alternativa en la alimentación animal, debido a sus características nutricionales y a su contenido de ácidos grasos insaturados, precursores del ácido v accénico y ruménico, beneficios para la salud humana, sin embargo existe poca información que reporte un análisis químico, perfil de ácidos grasos y digestibilidad del forraje ensilado como alternativa para la alimentación de rumiantes; por tanto, el objetivo de este estudio es determinar la calidad nutritiva y perfil de ácidos grasos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El cultivo de canola se estableció en una unidad de producción ubicada en el municipio de Ixtlahuaca, Estado de México, sus coordenadas son: 19° 28' 06" al 19° 44' 03" latitud norte y 99° 40' 43" al 99°54'59" longitud oeste, se encuentra a una altura promedio de 2500 msnm, el clima es templado subhúmedo, la precipitación media anual es de 828.4 mm y la temperatura media anual es de 14.8 ° C.

El cultivo se estableció el día 15 de octubre de 2016 en una unidad de producción, la siembra se realizó al voleo, con una densidad de siembra de 6 kg por hectárea, se fertilizó con N a una dosis de 100 kg/ ha, se realizaron dos riegos. El forraje se cosechó a los 148 días post siembra y fue cortado a un tamaño de partícula de 10 mm, posteriormente se procedió a la elaboración de los microsilos en tubos de PVC (4 pulgadas de diámetro por 20 cm de largo) utilizando una prensa para la compactación del forraje; se incluyó melaza como aditivo, la cual fue diluida en agua en proporción 1 a 1 (p/v) para facilitar el mezclado. Los microsilos fueron sellados con bolsas de plástico y cinta adhesiva.

Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Año 3. Vol.1 Núm.1. Noviembre 2017.

Los tratamientos fueron 0% melaza (EC-0), 1% de melaza (EC-1.), 2% de melaza (EC-2), 3% de melaza (EC-3) y 4% de melaza (EC-4). De cada tratamiento se elaboraron 3 repeticiones, las cuales se destaparon a los 28 días post sellado.

El día de apertura se midió el pH a cada microsilo con un potenciómetro digital (OAKTON®) y se procedió a realizar un pool con las tres repeticiones. En el laboratorio se determinó materia seca (MS) a 105° C durante 24 horas, se aplicó un factor de corrección de 1.08 para no subestimar pérdidas de compuestos volátiles, para el análisis de la composición química, una submuestra se secó a 55° C durante 72 horas para aminorar los daños por calor, los ensilados se molieron en un molino Willey con una malla de 2 mm, se obtuvo el contenido de cenizas por incineración en una mufla a 450°C por 4 h; se determinó el contenido de nitrógeno por el método kjeldalh, se determinó energía bruta con una bomba calorimétrica (6400 calorimeter); el análisis de FDN y FDA se realizó por el método descrito por Van Soest *et al.* (1991). Para esterificar los ácidos grasos (AG) del ensilado, se utilizó ácido clorhídrico metanólico al 10% en la esterificación y hexano como solvente orgánico.

Para evaluar la digestibilidad se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro*; para la incubación se usaron botellas de vidrio de 120 ml, se incubaron 0.99 ± 0.01 g de muestra en cada botella, asignando cuatro repeticiones por tres corridas, en cada corrida de incubación se contemplaron cuatro blancos. A cada botella se le adicionaron 90 ml de solución amortiguadora y 10 ml de líquido ruminal. La digestibilidad *in vitro* de la MS se evaluó a las 96 horas de incubación. El sustrato final se filtró en crisoles Gooch (#1), se secó en una estufa a 105 °C por una hora; se registró el peso; finalmente la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue determinada por diferencia de peso entre la MS inicial y la MS residual, la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) se calculó por diferencia de peso entre la MO inicial menos la MO residual. Para determinar la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutro (DIVFDN) los residuos de la fermentación en las botellas fueron removidos con 50 ml de solución FDN; posteriormente se colocaron en una autoclave a 105 °C por una hora, se filtraron en crisoles Gooch (#1) y el residuo se colocó en una estufa a 105 °C por una hora, se registró el peso seco del residuo.

El análisis estadístico empleado fue un diseño completamente al azar, el modelo general lineal fue:

$$Y = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde: Y es la variable respuesta, μ es la media general, T_i es el efecto del tratamiento y e_{ij} es el error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 1. Composición química de ensilados de canola con diferentes porcentajes de melaza (g kg⁻¹ MS)

	% Melaza					EEM ¹	P<
	0	1	2	3	4		
Materia seca	185.2 ^b	188.6 ^b	194.2 ^{ab}	199.81 ^a	202.3 ^a	2.25	<.0001
Materia orgánica	900.1 ^a	896.6 ^b	895 ^b	893.9 ^{bc}	892.1 ^c	0.66	<.0001
Proteína cruda	146.6 ^a	147.23 ^a	146.7 ^a	140.8 ^b	142.6 ^{ab}	1.23	0.0028
FDN	398.8 ^a	387.5 ^b	376.6 ^c	371 ^c	364.8 ^d	2.49	0.0113
FDA	206.1	204.5	200	204.7	204.6	3.58	0.7952
DIVMS	777 ^a	754.9 ^{ab}	751.3 ^{ab}	746.4 ^b	756.7 ^{ab}	6.31	0.0224
DIVFDN	617.93 ^a	615.5 ^{ab}	607.2 ^{ab}	601.9 ^b	603.2 ^{ab}	3.58	0.0113
DIVMO	696.9	703.4	692.2	686.3	695.8	3.89	0.058
EB ² (Mcal/ kg MS)	4.1	4.0	4.0	4.0	4.1		
pH	3.85	3.85	3.86	3.82	3.79		
Ácidos grasos (g /100 g AG)							
C12:0	1.84	1.81	1.2	1.49	1.68		
C14:0	0.16	0.24	0.20	0.23	0.3		
C16:0	20.82	20.83	20.55	22.63	20.7		
C16:1	0.52	0.56	0.37	0.37	0.63		
C18:0	2.97	3.1	2.92	3.14	2.65		
C18:1n9c	6.16	4.47	4.68	4.63	5.59		
C18:2n6c	9.98	11.53	10.25	10.57	11.15		

Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Memoria. Año 3. Vol.1 Núm.1. Noviembre 2017.

C18:3n3	36.57	35.8	35.3	32.09	36.3
≥ C:20	20.8	21.66	24.53	24.85	21

^{abc}Valores medios en la misma hilera con distinta literal son diferentes ($P < 0.05$).

¹EEM = Error estándar de la media. ²EB = Energía Bruta.

En la tabla 1 se muestra el análisis químico proximal y perfil lipídico de ensilados de canola con distintos porcentajes de melaza. El tratamiento con mejor comportamiento para MS, FND y pH fue con 4 % de melaza, el contenido de proteína fue similar para los tratamientos 0, 1 y 2 % de melaza e inferior para 3 y 4 % de melaza. La DIVMS fue mayor en el tratamiento 0 % de melaza concordando con Balakhial *et al.*, (2008) el cual obtuvo niveles más altos de digestibilidad en ensilados donde no incluyó melaza, el ensilado que presentó menor DIVFND fue con 3 % de melaza; para la DIVMO no hubo diferencias entre tratamientos. El perfil de ácidos grasos que muestran los ensilados con diferentes porcentajes de melaza es similar entre sí, mostrando valores altos de ácido linoleico (≥ 32.09)

CONCLUSIONES.

Se concluye que el forraje de canola puede ser ensilado para utilizarse en la alimentación de rumiantes presentando alta digestibilidad y aporte de nutrientes, así y como una fuente de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico y linolenico, los cuales son precursores para la síntesis de ácido linoleico conjugado y ácido vaccenico a nivel ruminal. El uso de melaza (4 %) como aditivo, mejora el porcentaje de materia seca, FDN; disminuye el pH, el cual es indicativo de una adecuada fermentación.

IMPLICACIONES.

Para desarrollar estrategias de alimentación que mejoren la calidad de los productos de los rumiantes (leche y carne) es necesario conocer el aporte nutricional del alimento, así como los efectos benéficos que estos proporcionan; el forraje de canola es rico en ácido linoleico, precursor del ácido linoleico conjugado, ácido benéfico para la salud humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Balakhial A, Naserian AA, Heravi MA, Eftekhari SF, and Vali ZR. Changes in chemical composition and *in vitro* DM digestibility of urea and molasses treated whole crop canola silage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*.2008; 7(9): 1042- 1044
- Barry TN. The feeding value of forage brassica plants for grazing ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 2013; 181, 15-25
- Fales SL, Gustine DL, Bosworth SC, Hoover RJ. Concentrations of glucosinolates and S-methylcysteine sulfoxide in ensiled rape (*Brassica napus* L). *J Dairy Sci*. 1987; 70, 2402-2405
- Van Soest PJ, Roberson JB, Lewis BA. Methods for dietary fibre, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991; 74: 3583-3897.
- Williams SRO, Moate PJ, Deighton MH, Hannah MC, Wales WJ, Jacobs JL. Milk production and composition, methane emissions from dairy cows fed Lucerne hay with forage brassica or chicory. *Animal Production Science*.2016; 56, 304–311.

