



TESIS DOCTORAL

**Estudio de distintos subproductos agrarios, mediante
sistemas de fermentación *in vitro*, como agentes mitigadores
de la producción de metano en rumiantes**

Carmen Barraso Gil

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

2022



TESIS DOCOTRAL

**Estudio de distintos subproductos agrarios, mediante
sistemas de fermentación *in vitro*, como agentes mitigadores
de la producción de metano en rumiantes**

Carmen Barraso Gil

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Esta tesis cuenta con la autorización de los directores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

Fdo.:Dr. Pedro Luís Rodríguez Medina

Fdo.:Dra. María Montaña López Parra

2022



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

MARÍA MONTAÑA LÓPEZ PARRA, doctora en Veterinaria e investigadora del CICYTEX y PEDRO LUIS RODRÍGUEZ MEDINA, doctor en Veterinaria y profesor de la Facultad de Veterinaria de Cáceres,

INFORMAN

Que el trabajo presentado por la Graduada en Veterinaria D^a Carmen Barraso Gil titulado “Estudio de distintos subproductos agrarios, mediante sistemas de fermentación *in vitro*, como agentes mitigadores de la producción de metano en rumiantes” ha sido realizado bajo su dirección y supervisión en las instalaciones del CICYTEX (Finca la Orden-Valedesequera) y en las instalaciones del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos (Nutrición Animal). Dicho trabajo cumple con las condiciones exigibles para optar al grado de Doctor.

Fdo.: Dra. María Montaña López Parra

Fdo.: Dr. Pedro Luís Rodríguez Medina



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Agencia Estatal de Investigación, por la concesión de la beca **CPD2016-0037**, para la formación de personal investigador en agroalimentación en los centros de investigación INIACC.AA (FPI-INIA), en el marco del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016.

La realización de esta Tesis se ha llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Agrarias Finca la Orden-Valdesequera, adscrito al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).

*A las mujeres de mi vida,
quienes fueron, son y serán mi mayor referente.*

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Pedro Luís Rodríguez Medina y María Montaña López Parra, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Vuestra dedicación y asesoramiento científico han sido cruciales para la elaboración de esta tesis. Gracias por guiarme durante esta etapa.

Al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) y a la Universidad de Extremadura, por poner a mi disposición todos los recursos necesarios para poder llevar a cabo los trabajos realizados durante estos cuatro años.

A todo el personal involucrado en el desarrollo de este trabajo, M^a Jesús, Yolanda, Juan Carlos, José Antonio, Óscar y Alfredo. Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A las cooperativas agroalimentarias por su disposición y colaboración.

A mis padres, quienes forjaron los cimientos de mi educación basada en respeto, gratitud, esfuerzo y cariño. Gracias por dedicar una vida por y para vuestros hijos.

A mis hermanos, José, Juan, María, Ramoni y Santi, gracias por ser y estar en cada momento que os he necesitado.

A Pepe, mi compañero de vida, por ser hogar, refugio y salvavidas.

A mis amigos, los de toda la vida y a los que me llevo de esta maravillosa etapa, gracias por llenarme de momentos maravillosos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen / Summary	3
1.-Introducción	11
2.-Revisión bibliográfica	17
2.1.-GEI: importancia y relación con la ganadería.....	17
2.2.-Subproductos agrícolas: valor alimenticio, limitaciones y oportunidad frente a GEI.....	36
2.3.-Fermentación <i>in vitro</i> como modelo de estudio de la metanogénesis y el valor nutritivo de alimentos en rumiantes.....	51
3.-Objetivos	65
4.-Material y métodos	69
5.-Resultados y discusión	83
Capítulo I	85
Introducción.....	90
Material y métodos.....	92
Resultados y discusión.....	93
Conclusión.....	101
Referencias bibliográficas.....	101
Capítulo II	109
Introduction.....	114
Material and methods.....	114
Results.....	116
Discussion.....	125
Conclusions.....	127
Bibliographic References.....	127
Capítulo III	133
Introducción.....	136
Material y métodos.....	138
Resultados.....	141
Discusión.....	147

Conclusiones.....	152
Referencias bibliográficas.....	153
Capítulo IV.....	161
Introducción.....	164
Material y métodos.....	166
Resultados.....	169
Discusión.....	176
Conclusiones.....	178
Referencias bibliográficas.....	179
6.-Conclusiones.....	187
7.-Referencias bibliográficas.....	191
8.-Anexos.....	207
Listado de abreviaturas.....	209
Índice de figuras.....	211
Índice de tablas.....	215

Resumen/Summary

Resumen

La agricultura y ganadería juegan un papel fundamental en el desarrollo socioeconómico de España, acentuándose en el caso de la región extremeña. Estas actividades contribuyen tanto al mantenimiento de los ecosistemas como al asentamiento de la población. Extremadura es la región con mayor censo ovino de España y destaca en la producción vitivinícola y olivarera. Sin embargo, tanto la ganadería como la agricultura sienten la amenaza de contribuir al cambio climático, al generar subproductos y gases de efecto invernadero a lo largo de su cadena productiva, siendo el metano el principal gas de este tipo, asociado principalmente al sector ganadero como resultado de la fermentación digestiva de los rumiantes. Frente a ello, desde el campo de la nutrición animal, se plantean diferentes estrategias que permitan mitigar el impacto ambiental del metano. Entre ellas, se propone la incorporación de subproductos ricos en sustancias bioactivas como los polifenoles, capaces de actuar a nivel ruminal reduciendo la metanogénesis mediante diferentes mecanismos. Como estrategia complementaria, el uso de concentrados amiláceos de degradación lenta, puede reducir la producción de metano al escapar del rumen sin ser degradados en su totalidad.

El objetivo de la presente tesis doctoral es evaluar, mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, el potencial fermentativo y antimetanogénico de diferentes subproductos agroindustriales como el orujo de uva y la hoja de olivo. Igualmente, se analizan estos mismos aspectos en cereales con diferente estructura amilácea (cebada y maíz). Para ello, se desarrollaron cuatro trabajos sintetizados en los siguientes capítulos:

Capítulo I: el objetivo de este estudio ha sido evaluar la cinética de producción de gas, así como la producción final de metano de 15 variedades de orujos de uva (blancos y tintos), con el fin de seleccionar aquellas variedades que sean menos metanogénicas y poder incorporarlas en un pienso de cebo de corderos. Para ello, se han utilizado dos periodos de fermentación diferentes, 18 y 96 horas. Los resultados obtenidos para la producción de gas a 18 y 96 horas han sido diferentes, en los orujos tintos: 59,77-104,28ml/g y en los blancos: 94,44-173,23ml/g

respectivamente. En cuanto a la producción de metano, también fueron diferentes: 3,72-6,79ml metano/g en orujos tintos frente a 9,66-26,08ml metano/g en los orujos blancos. Por tanto, se observa un mayor potencial inhibitor de la producción de gas y metano por parte del grupo de orujos tintos frente al de los orujos blancos.

Capítulo II: el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que produce la incorporación de cuatro orujos de uva tinta variedad *Tempranillo* procedentes de diferentes bodegas y en concentraciones diferentes (1,25%, 2,5%, 5% y 7,5%) sobre un concentrado tipo (cebada). Se fermentaron durante 18 y 96 horas para evaluar la producción de gas total y de metano. Se observó un efecto inhibitor cuantitativo para ambos parámetros al incorporar un 7,5% de orujo, así como un efecto cualitativo variable en función del tiempo de fermentación. Por tanto, la incorporación de orujo de uva en los piensos de cebo de rumiantes podría ser una posible alternativa a los problemas ambientales del sector agrario dentro de un modelo de economía verde y circular.

Capítulo III: el objetivo inicial de este estudio fue evaluar el efecto que ejerce la incorporación de 2,5%, 5%, 7,5% y 10% de hoja de olivo sobre el potencial fermentativo de un concentrado tipo (cebada). Posteriormente se diseñó un sistema de conservación basado en el ensilado de hojas de olivo combinando diferentes niveles de urea (2%, 4% y 6%) y melaza (2%, 4% y 6%), valorando su potencial energético, fermentativo y metanogénico *in vitro* frente a hojas frescas y desecadas. La incorporación de un 10% de hoja de olivo en el concentrado disminuyó la producción de gas y metano un 14,58% y 26,78% respectivamente. El ensilado formulado con un 2% urea y 2% melaza presentó el nivel energético más alto y muy próximo al del subproducto fresco, aumentando el porcentaje de digestibilidad *in vitro*. La producción de metano aumentó cuando el subproducto fue ensilado y disminuyó con el desecado.

Capítulo IV: el objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento fermentativo de un sistema de mezclas cebada/maíz, (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100), así como, el de un concentrado comercial de cebo de terneros con diferentes niveles de maíz(41%, 43%, 44,85%). Las mezclas de cebada/maíz se fermentaron durante un periodo de 18 horas, mientras que los concentrados se fermentaron durante 18 y 96 horas. Para las mezclas cebada/maíz, la menor producción de gas correspondió al 100% de maíz (207,97ml/g), aumentando la producción de metano en 0,11ml metano/g por cada punto porcentual de cebada añadido. En los concentrados, tras la fermentación de 18 horas, la menor producción de gas se asoció al concentrado control (165,47ml/g), mientras que el concentrado con mayor nivel de maíz obtuvo una menor producción de metano (15,76ml metano/g). Tras 96 horas de fermentación, la mayor producción de gas y metano (369,82ml/g y 161,22ml/g respectivamente) correspondió al concentrado con mayor nivel de maíz. Por tanto, la inclusión de maíz en la formulación de concentrados de cebo de terneros se traduce en una menor producción de metano *in vitro* tras un periodo fermentativo de 18h.

Summary

Agriculture and livestock play a crucial economic role in Spain, and even more so in the Extremadura region. These activities contribute to the maintenance of the ecosystem and the settlement of the human population. Extremadura has the highest number of sheep in Spain and stands out for its wine and olive production. However, both livestock and agriculture can contribute to climate change by generating by-products and greenhouse gases in the production chain. Methane is the main greenhouse gas associated with the agro-livestock sector and its main source of emission is rumen fermentation. Different strategies have been proposed by specialist in animal nutrition to mitigate the environmental impact of methane emission. Among them, it has been suggested to incorporate by-products rich in bioactive substances such as polyphenols, capable of acting at the rumen level by reducing methanogenesis through different mechanisms. As a complementary strategy, the use of slowly degraded starch concentrates can reduce methane production by escaping from the rumen without being fully fermented.

The aim of this doctoral thesis is to evaluate the fermentative and antimethanogenic potential of different agro-industrial by-products such as grape pomaces and olive leaves using the *in vitro* gas production technique. These same variables are also analyzed in cereals with different starch structure (barley and corn). For this purpose, four studies with specific objectives were carried out, with the following results:

Chapter I: the aim of this study was to evaluate the kinetics of gas production and methane production of 15 varieties of grape pomace (white and red), in order to select the least methanogenic varieties that can be added to the feedstuff for fattening lambs. For this purpose, two different fermentation periods were used, 18 and 96 hours. The results obtained for gas production at 18 and 96 hours were different, with red marc: 59,77-104,28ml/g and white marc: 94,44-173,23ml/g respectively. Methane production was also different: 3,72-6,79 ml methane/g in red marc versus 9,66-26,08 ml methane/g in white marc. Therefore, a higher potential inhibition of gas and methane production is observed for the red marc group compared to the white marc group.

Chapter II: the aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different levels of grape pomace (1,25%, 2,5%, 5% and 7,5%) to a type of concentrate (barley). Four red grape pomaces (*Tempranillo* variety) obtained from different wineries were used. The mixtures were fermented for 18 and 96 hours to evaluate gas and methane yields *in vitro*. A quantitative inhibitory effect was observed for both parameters when 7,5% grape pomace was incorporated into the mixture, as well as a qualitative effect that varied according to the fermentation time. Therefore, the incorporation of grape pomace in ruminant fattening concentrates might be a possible alternative to the environmental problems of the agricultural sector within a green and circular economy model.

Chapter III: The initial aim of this study was to evaluate the effect on the *in vitro* fermentative and methanogenic characteristics of the addition of different levels of olive leaves (2,5%, 5%, 7,5% and 10%) to one type of concentrate (barley). A conservation system was then designed based on olive leaf silage combining different levels of urea (2%, 4% and 6%) and molasses (2%, 4% and 6%). The fermentative, nutritive and methanogenic potential was evaluated and compared with the original fresh and dried by-product. The incorporation of 10% olive leaves in the concentrate decreased gas and methane production by 14,58% and 26,78%, respectively. The silage formulated with 2% urea 2% molasses had the best nutritional value and %DMO compared to the rest of the formulations. *In vitro* methane production increased when the by-product was ensiled and decreased when it was dried.

Chapter IV: the aim of this study was to evaluate the effects on ruminal fermentation of different levels of inclusion of corn starch in a barley/corn mixture system, as well as a commercial calf feedstuff based on *in vitro* analysis of gas and methane production. The barley/corn mixtures were fermented for 18h, while the feedstuffs were fermented for 18 and 96h. For the barley/corn mixtures, the lowest gas production level was observed in the 100% corn (207,97ml/g), increasing methane production by 0,11 ml methane/g for each percentage point of barley added. In the feedstuff, after 18h fermentation, the lowest level of gas production was obtained in the control one (165,47ml/g), while the feedstuff with a higher starch level led to the lower methane production (15,76ml methane/g). After 96h of fermentation, the highest gas and methane production level (369,82ml/g and 161,22ml methane/g respectively) corresponded to the lowest starch level. The inclusion of corn in the calf feedstuff formulation limits on methane production *in vitro*.

Introducción

1.-Introducción

La actividad agroganadera juega un papel importante a nivel mundial. Este sector tiene el fuerte compromiso y la responsabilidad de proporcionar alimentos seguros y de calidad a toda la población. Sus actividades ligadas a la tierra, suponen el principal motor económico de la España rural, además de contribuir al mantenimiento y conservación de paisajes y ecosistemas de importante valor ambiental, en especial cuando se trata de sistemas de producción extensivos (Manzano, 2019).

La región extremeña, destaca por censar el 21% del total de la cabaña ganadera rumiante del país, siendo la principal región productora de ganado ovino nacional (**Figura 1**), con un total de 3.733.640 cabezas de ganado (MAPA, 2020). En el prisma de la producción agraria, la región despunta en cultivos como la vid o el olivo (ESYRCE, 2021) encabezando las primeras posiciones en cuanto a hectáreas de terreno cultivadas. Finalmente, como indicador real de la importancia del sector agroganadero en la región, hay que señalar que la tasa de empleo representa el 10,7% de la población activa, siendo el segundo sector con más peso en la región (Junta de Extremadura, 2021)

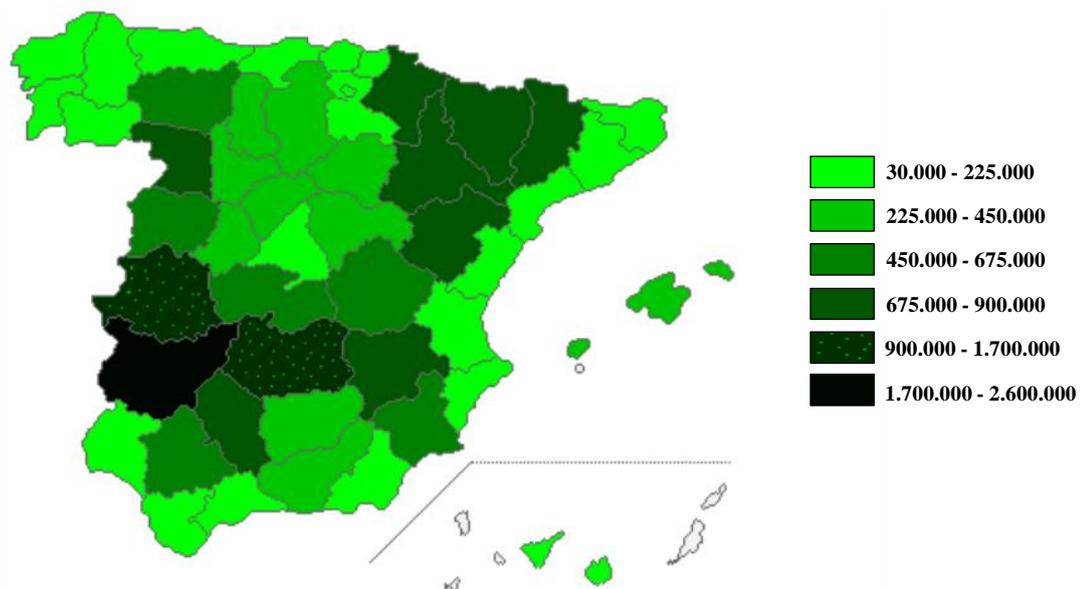


Figura 1.- Distribución del censo ovino en España. Fuente: (MAPA, 2020).

Sin embargo, estas producciones ganaderas presentan el aspecto negativo de contribuir activamente al desarrollo del cambio climático, siendo este fenómeno uno de los mayores retos a los que se enfrenta la población actual (Roca *et al.*, 2019). Su contribución radica en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) a lo largo de la cadena de producción, siendo el metano (CH₄), el principal GEI emitido por este sector y cuya principal fuente de generación es la fermentación ruminal (MITECO, 2021). Por otro lado, el desarrollo de las industrias transformadoras de materias primas agrarias, generan ingentes cantidades de subproductos agroindustriales que suponen un problema medioambiental y de gestión para las industrias (Barragán *et al.*, 2008).

Frente a esta problemática, se plantean diferentes estrategias con el fin de reducir las emisiones de GEI del sector primario, adaptando los sistemas productivos a las nuevas políticas agrarias centradas en la reducción del impacto medio ambiental. Dentro de ellas, existe un grupo enfocado en modificar la dieta de rumiantes.

De este modo, la incorporación de subproductos ricos en sustancias bioactivas en la alimentación de rumiantes, podría ser una posible estrategia para mitigar las emisiones de CH₄ ruminal, debido a las propiedades que presentan estos compuestos (Goel y Makkar, 2012). Además, esta estrategia presenta un doble beneficio, ya que permite reutilizar los excedentes de las industrias agroalimentarias, cerrando el ciclo productivo y generando un sistema de economía verde y circular, alcanzando el fin propuesto que radica en una producción más sostenible y resiliente con el medio ambiente.

Las técnicas de fermentación *in vitro*, nos permiten obtener una estimación aproximada de la cinética de fermentación y producción de gas de un sustrato en el rumen; de este modo, podemos obtener resultados preliminares y analizar cuan eficaz resultan las estrategias planteadas de una manera previa a las pruebas *in vivo* (Jayanegara *et al.*, 2012).

En función de todo lo anterior, en la presente tesis doctoral con una orientación claramente práctica, se hace una valoración *in vitro* de la capacidad antimetanogénica de diferentes subproductos agroindustriales incorporados en la dieta de rumiantes, bien como parte del concentrado, o bien, como fuente de forraje, así como, el uso de diferentes fuentes de almidón en la formulación de concentrados de cebo y su influencia sobre la producción de CH₄.

Revisión bibliográfica

2.-Revisión bibliográfica

2.1.-GEI: importancia y relación con la ganadería

2.1.1- Cambio climático y gases de efecto invernadero

El cambio climático, es definido, como un cambio del clima atribuido de forma directa o indirecta a las actividades antropogénicas y que se suma a la variabilidad natural climática histórica (ONU, 1992). Este fenómeno, consiste principalmente en el calentamiento del planeta a consecuencia del atrapamiento excesivo de calor en las capas más bajas de la atmósfera originado por los GEI. Estos GEI se encuentran de manera natural en la atmósfera, y, su principal función radica en absorber la radiación emitida, reteniendo calor y manteniendo la temperatura idónea para el desarrollo de la vida en el planeta (Kansri *et al.*, 2018). Sin embargo, en las últimas seis décadas, se ha evidenciado que las actividades antropogénicas han contribuido de manera significativa a las emisiones de GEI, lo cual, ha provocado un incremento paulatino de la temperatura del planeta con el consiguiente cambio climático observado (Moss, 1994; Roca *et al.*, 2019).

Los efectos atribuidos al cambio climático son diversos y evidentes (Roca *et al.*, 2019), tales como:

- Aumento de la temperatura global del planeta, de manera continua y progresiva, tanto en continentes como en mares y océanos, ocasionando el deshielo de los glaciares y, por ende, el aumento del nivel del mar.
- Mayor frecuencia de fenómenos meteorológicos extremos e impredecibles, como lluvias torrenciales y largos periodos de sequía.
- Riesgo de extinción de determinadas especies animales y plantas, debida a la degradación de los ecosistemas y la reducción de las condiciones hídricas de muchas regiones.
- Amenaza de las producciones agrarias y ganaderas, ya que los fenómenos meteorológicos extremos comprometen la productividad agraria, así como la salud y el abastecimiento de comida de la cabaña ganadera.
- Incremento e intensificación de incendios forestales.

- Problemas de salud, asociados a la contaminación, causando enfermedades cardiovasculares y respiratorias, así como, la aparición de enfermedades transmitidas a través de vectores como mosquitos y otros insectos.

Por lo tanto, en su conjunto, supone un cambio drástico de las condiciones ambientales observadas hasta hoy.

Los principales GEI son: vapor de agua, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6), siendo el CO_2 , el que presenta una mayor concentración en la atmósfera, seguido del CH_4 y del N_2O (**Figura 2**).

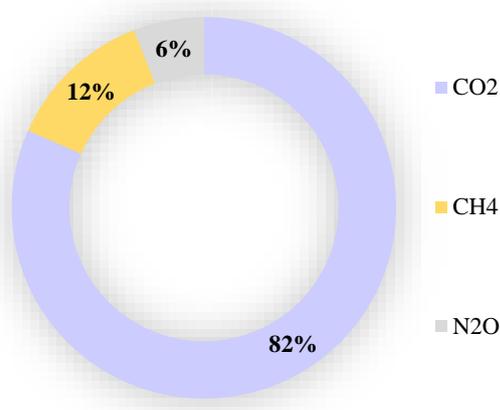


Figura 2.- Concentración de GEI en la atmósfera. Elaboración propia, fuente: (MITECO, 2021).

Sin embargo, no todos los GEI presentan el mismo potencial de calentamiento ni el mismo tiempo de permanencia en la atmósfera, por lo que se ha llegado a promover y establecer una normalización de los diferentes GEI en términos de su Potencial de Calentamiento Global (PCG), el cual, se define como el efecto de calentamiento integrado a lo largo del tiempo que produce hoy una liberación instantánea de 1kg de un GEI, en comparación con el causado por el CO_2 . De esta forma, se pueden tener en cuenta los efectos térmicos, de cada gas, así como sus diferentes periodos de permanencia en la atmósfera. El CO_2 se consideró como GEI de referencia, asociándole un valor de PCG de 1, en el caso del CH_4 su valor de PCG es de 25, mientras que el del N_2O es 298. Así, 1kg

CH₄ equivale a 25kg CO₂ y 1kg N₂O equivale a 298kg CO₂ (IPCC, 2013; ECONOMETRICA, 2015).

Por otro lado, el peso de las emisiones de GEI de origen antropogénico varía en función del sector de procedencia. A nivel global, las cadenas de suministro ganadero contribuyen, de forma notoria, al total de las emisiones provocadas por el ser humano. Se estima que son responsables de la emisión de 7,1 gigatoneladas (GT) de CO₂ equivalente (CO₂-eq) por año. Esto equivale al 14,5% de las emisiones inducidas por el hombre (Gerber *et al.*, 2013). A nivel mundial, el ganado vacuno es el principal contribuyente de emisiones en el sector ganadero con alrededor de 4,6GT de CO₂-eq, lo que supone el 65% de las emisiones derivadas de las actividades pecuarias (Gerber *et al.*, 2013).

En la **Figura 3** se representan las emisiones globales de las cadenas de suministro ganadero por categorías. Se observan los porcentajes respectivos para los diferentes procesos que contribuyen al total de emisiones producidas. De mayor importancia resulta la fermentación entérica, seguida del manejo de los suelos y la elaboración de piensos.

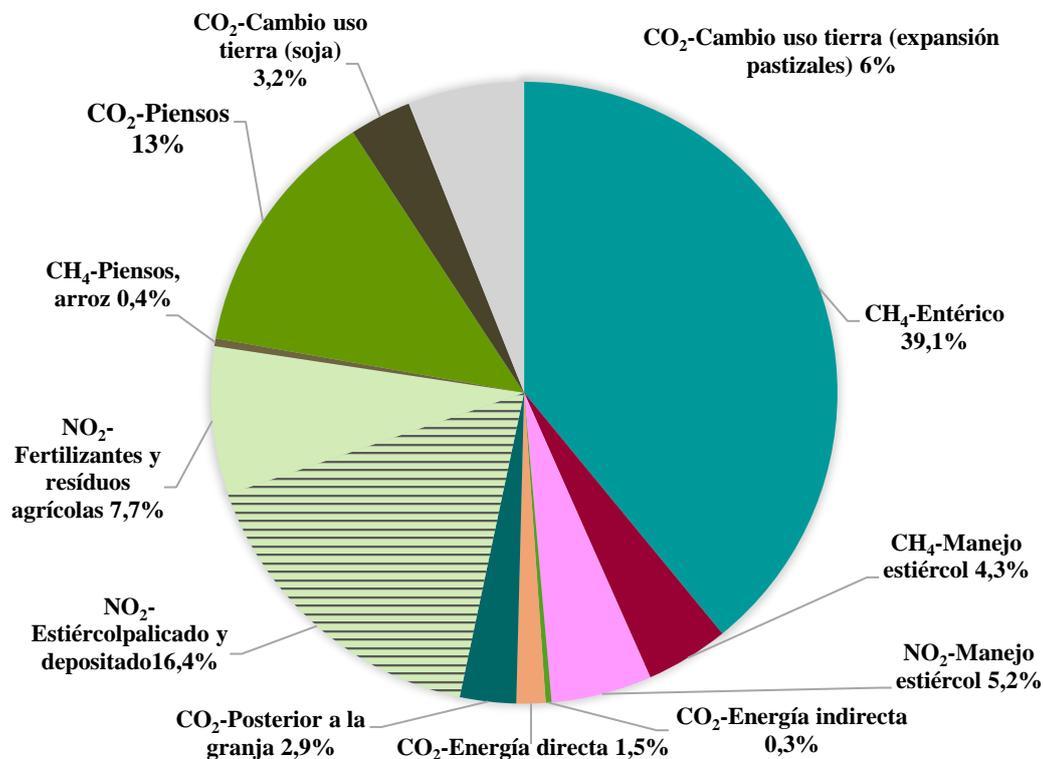


Figura 3.- Emisiones de GEI globales en las cadenas de suministro ganadero. Fuente: (Gerber *et al.*, 2013).

Centrándonos en el panorama nacional, los últimos datos aportados sobre las emisiones generadas por los diferentes sectores, apuntan que, el sector con mayor peso global es el del transporte (26,9%), seguido de las actividades industriales (24,3%), la generación de electricidad (13,7%), la agricultura y ganadería en conjunto (12,0%), el consumo de combustibles en el sector residencial, comercial e institucional (8,9%), y los residuos (4,4%) (MITECO, 2021).

En cuanto al sector agroganadero, en el año 2019, registró una emisión de 37.794,5KT CO₂-eq, en cuyo desglose (**Figura 4**), podemos observar que el CH₄ encabeza el ranking de gases emitidos, seguido del N₂O y en menor medida el CO₂. Del total de CH₄ emitido, un 68,4% procede de la fermentación entérica, 29,69% es producido por la gestión de estiércoles, el 1,81% por el cultivo del arroz, mientras que el 0,096% restante procede de la quema de residuos agrícolas, por lo cual, la ganadería y, especialmente los rumiantes, son los principales focos emisores de GEI de este sector (MITECO, 2021).

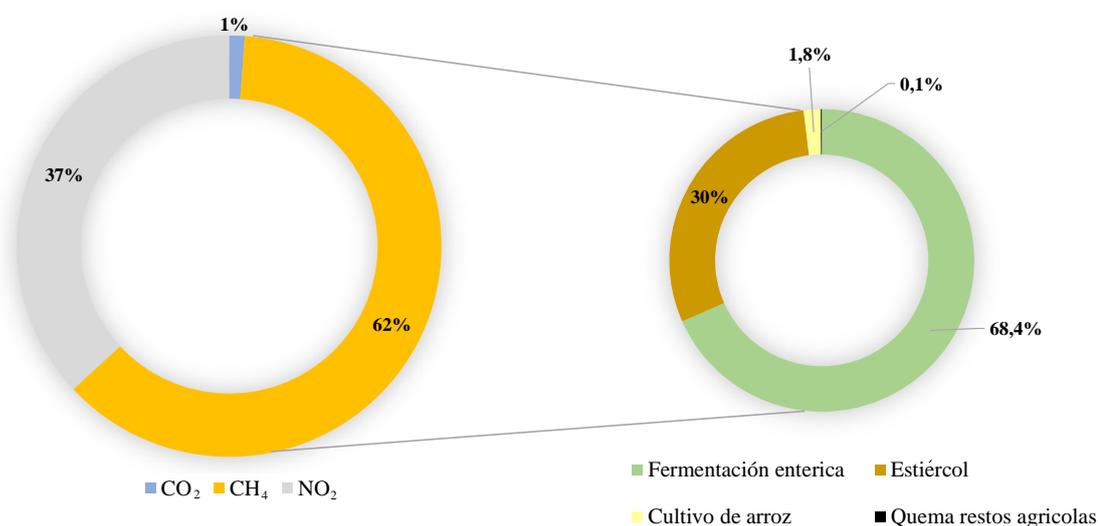


Figura 4.- Emisiones nacionales de GEI del sector agroganadero, fuentes de emisión de CH₄.
Elaboración propia, fuente : (MITECO, 2021).

2.1.2-Rumiantes como generadores de CH₄

Los rumiantes se caracterizan por presentar un sistema digestivo policavitario, formado por tres preestómagos (rumen, retículo, omaso) y un verdadero estómago glandular (abomaso) (**Figura 5**). Esta particularidad anatómica, les permite obtener energía a partir del material fibroso, a través de los procesos fermentativos llevados a cabo por los microorganismos que hospedan el saco ruminal (Choudhury *et al.*, 2015; Owens y Basalan, 2016).

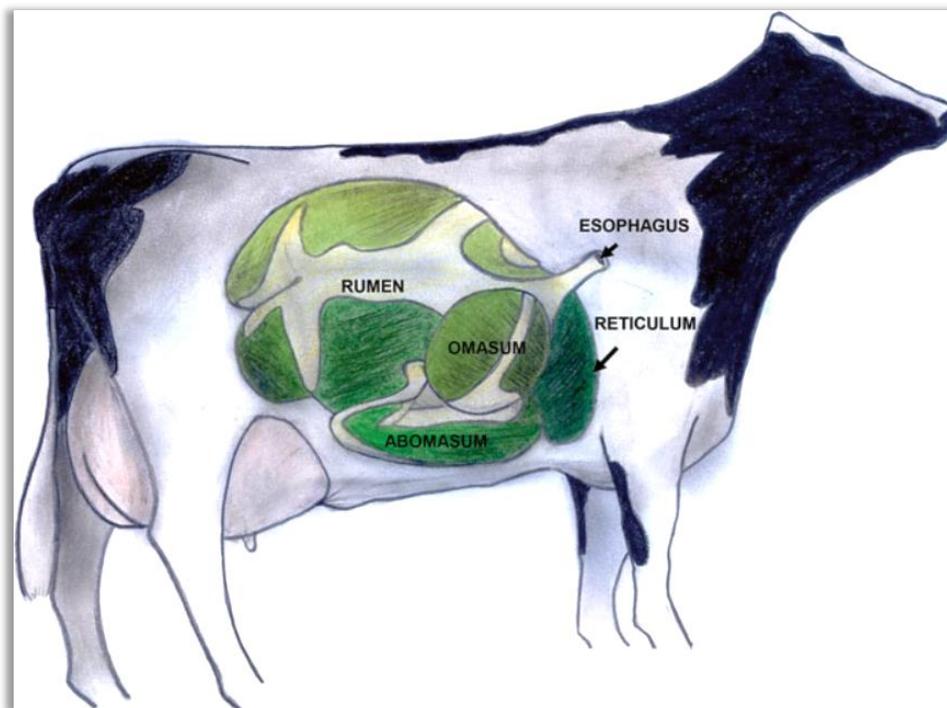


Figura 5.- Vista lateral derecha de un bovino adulto. Diferentes segmentos anatómicos del aparato digestivo: esófago, retículo, rumen, omaso y abomaso. Fuente: (Membrive, 2016).

2.1.2.1-Microbiota ruminal

El ecosistema ruminal es bastante complejo, se caracteriza por ser un medio anaeróbico, con una temperatura entre 38-40°C y un nivel de acidez que fluctúa entre pH 5,5-7, controlado por el efecto tampón que ejerce la saliva (Palma-Hidalgo *et al.*, 2021). El grupo de microorganismos que habitan en el rumen es muy numeroso. Existe una gran variedad de especies y géneros de bacterias, protozoos, hongos, metanógenos y bacteriófagos.

Tabla 1.- Clasificación de las bacterias ruminales en función del sustrato degradado.
Fuente: (Relling y Mattioli, 2003).

BACTERIAS	FUNCIONALIDAD	PRODUCTOS DEL METABOLISMO
<i>Celulolíticas</i>	Fermentan ¹ H.C fibrosos (celulosa, hemicelulosa, pectinas)	² AGV (acético)
<i>Amilolíticas</i>	Fermentan H.C de reserva de granos (almidón)	AGV (propiónico)
<i>Sacarolíticas</i>	Fermentan H.C simples (azúcares vegetales)	AGV (butírico)
<i>Lactolíticas</i>	Metabolizan en lactato	AGV (propiónico)
<i>Lipolíticas</i>	Metabolizan las grasas	Ácidos grasos libres y AGV (propiónico)
<i>Proteolíticas</i>	Degradan las proteínas	AGV y NH ₃
<i>Metanógenas</i>	Producen CH ₄	CH ₄
<i>Ureolíticas</i>	Hidrolizan urea	CO ₂ y NH ₃

¹H.C: hidratos de carbono.; ²AGV: ácidos grasos volátiles

Las bacterias son el grupo de microorganismos más abundante del rumen, representan aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal y su concentración oscila entre 10⁸ y 10¹¹/g de líquido ruminal (Nagaraja, 2016). La amplia variedad de especies que cohabitan en el rumen pueden ser clasificadas bajo diferentes criterios, uno de ellos, se basa en el tipo de sustrato fermentado (**Tabla 1**), aunque esta clasificación no es excluyente, ya que, una misma especie bacteriana puede cumplir más de una función metabólica. Su papel en la fermentación ruminal, es esencial, ya que intervienen en la degradación de la mayoría de los componentes del alimento (H.C fibrosos y H.C no fibrosos, proteínas y lípidos), además, de llevar a cabo la síntesis de proteína microbiana a partir de fuentes de nitrógeno no proteicos (NNP), principalmente amoníaco (NH₃) (Zhou *et al.*, 2015). Dentro de las condiciones que caracterizan al ecosistema ruminal, el pH es un factor fundamental e influyente que afecta de manera directa al crecimiento y desarrollo de la actividad bacteriana. De este modo, encontramos un mayor desarrollo y

actividad de la flora celulolítica a $\text{pH} > 6,0$, mientras que la flora amilolítica necesita pH más ácidos ($\text{pH} < 6,0$) (Granja-Salcedo *et al.*, 2016).

Los protozoos (la mayoría de las especies son ciliados) se encuentran en concentraciones del orden de 10^4 a $10^6/\text{g}$ de líquido ruminal, inferior a la concentración bacteriana, si bien, por su gran tamaño, representan una masa total similar a la bacteriana (Wright, 2015; Nagaraja, 2016). Estos microorganismos se desarrollan a pH superiores a 6 y son implantados en el rumen desde el medio que rodea al animal. Desde el punto de vista metabólico, se diferencian de las bacterias por presentar una menor actividad celulolítica, además de no ser capaces de sintetizar proteínas a partir del NNP. Su principal función radica en la fermentación amilolítica, debido a que consumen bacterias amilolíticas, a la vez que fagocitan gránulos de almidón (Relling y Mattioli, 2003).

Los hongos representan el 8% de la microbiota ruminal (Nagaraja, 2016). La baja densidad de estos microorganismos en el rumen se asocia a su lento proceso de multiplicación en comparación con el de las bacterias. Estos microorganismos intervienen principalmente en la degradación de la fibra (Fliegerova *et al.*, 2015).

Los metanógenos son microorganismos del dominio Archaea diferenciados filogenéticamente de las bacterias, hongos y protozoos. Carecen de peptidoglicano y tienen estructuras lipídicas inusuales (Cersosimo y Wright, 2015). Los metanógenos constituyen alrededor del 2-4% de la población bacteriana del rumen (10^5 - $10^8/\text{g}$ de líquido ruminal). El metanógeno más prevalente y mejor caracterizado en el rumen es *Methanobrevibacter ruminantium*. La mayoría de las especies de metanógenos pueden crecer utilizando hidrógeno (H_2) y formiato como fuentes de energía para reducir el CO_2 y formar CH_4 (Nagaraja, 2016; Min *et al.*, 2020).

Los bacteriófagos son virus compuestos de ácidos nucleicos (ADN o ARN, de cadena simple o doble) y proteínas. Su concentración en el rumen está en torno a 10^{11} - $10^{12}/\text{g}$ de líquido ruminal (Gilbert y Klieve, 2015). En cuanto a su función, es posible que contribuyan al reciclaje de nutrientes y tengan alguna influencia en la composición de especies o de la población bacteriana en el rumen (Nagaraja, 2016).

Todos estos microorganismos interactúan de forma cooperativa dentro de este complejo ecosistema, con el fin de maximizar la eficiencia fermentativa del alimento y donde la acción de una especie sobresale de otra en función de las condiciones

ambientales que se den en el rumen, determinadas principalmente por el tipo de sustrato fermentado (De Blas *et al.*, 2008).

Dentro de los diferentes nutrientes que componen la dieta de un rumiante, los hidratos de carbono junto con las proteínas constituyen los principales sustratos fermentables por los microorganismos. A partir de ellos, obtienen energía y nitrógeno para su crecimiento.

2.1.2.2-Fermentación hidratos de carbono

Los hidratos de carbono conforman la mayor parte de la dieta de los rumiantes y suponen la principal fuente de energía tanto para los microorganismos como para el animal (Rotger, 2004).

Desde el punto de vista nutricional, estos compuestos se pueden clasificar en fibrosos (corresponden a la fibra neutro detergente (F.N.D) de Van Soest, (1982)) y no fibrosos (**Figura 6**).

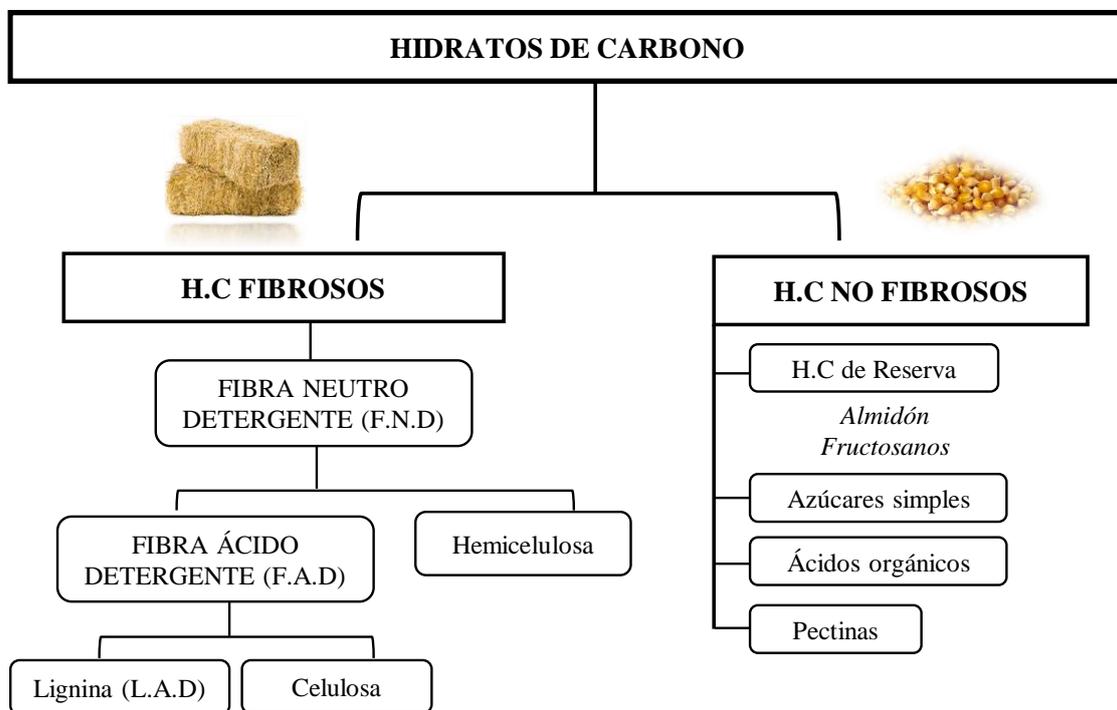


Figura 6.- Clasificación de los hidratos de carbono. Elaboración propia, fuente: (Van Soest, 1982)

Los hidratos de carbono son hidrolizados extracelularmente en pequeños oligómeros y monómeros por la acción de las enzimas bacterianas y fúngicas. Seguidamente son transportados al interior de la célula para su posterior metabolización. Tras su catabolismo, producen ácidos AGV (**Figura 7**), que son excretados al medio ruminal y posteriormente absorbidos a través de la pared ruminal, constituyendo el 60% de la energía absorbida en el aparato digestivo. Los AGV son el ácido fórmico, acético, láctico, propiónico, butírico, isobutírico, 2-metil butírico, valérico, isovalérico, caproico y caprílico, siendo el acético, propiónico y butírico los que se producen en mayor cantidad. La producción de un tipo de AGV u otro va a depender de la composición de la dieta, la actividad microbiana y el pH del medio.

Cuando la dieta se compone principalmente de forrajes o pastos, donde predomina la concentración de carbohidratos fibrosos, se genera una fermentación lenta con un mayor estímulo de la rumia. Esta digestión es llevada a cabo principalmente por bacterias celulolíticas y hongos, los cuales, desarrollan su actividad a pH altos ($\text{pH} > 6,0$), dando lugar a una mayor proporción de ácido acético (60-75%) en comparación con el propiónico (15-19%) y butírico (8-16%) (Nozière *et al.*, 2011). El acético se convierte en triglicéridos en los adipocitos, donde se almacena como grasa y a nivel de la glándula mamaria también se transforma en grasa (Membrive, 2016).

En el caso de dietas basadas en concentrados, donde existe un predominio de carbohidratos no fibrosos (almidón y fructanos principalmente), se genera una fermentación rápida por las bacterias amilolíticas, produciendo una alta cantidad de AGV y dando lugar a un descenso del pH ruminal ($\text{pH} < 6,0$). La velocidad de fermentación y la acidificación del pH va a depender del tipo de grano y la estructura de su endospermo, así como de su procesamiento (Cheng *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2019). La acidificación del medio ruminal es el gran riesgo que presentan este tipo de dietas, ya que disminuyen el estímulo de rumia, y, por ende, el efecto tampón que ejerce la saliva sobre el líquido ruminal, limitando el desarrollo de la flora celulolítica y causando fenómenos patológicos como la acidosis ruminal (Días y Durante, 2015).

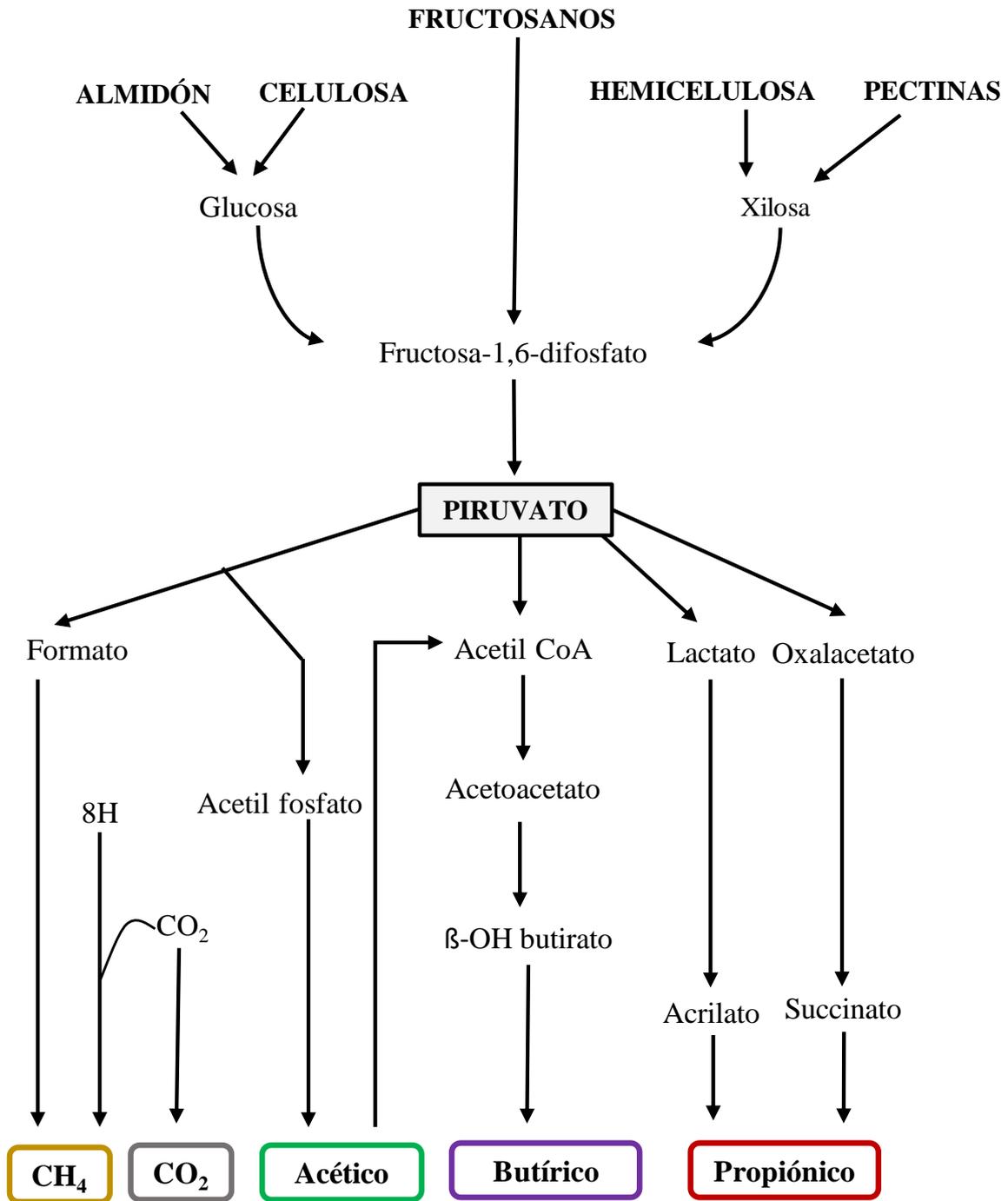


Figura 7.- Fermentación de los carbohidratos en el rumen. Elaboración propia, fuente (Leek, 2009)

Los protozoos también intervienen en el proceso digestivo del almidón, estos microorganismos actúan fagocitando los gránulos de almidón y fermentándolos lentamente, contribuyendo a ralentizar el ritmo de fermentación del almidón evitando grandes fluctuaciones de pH (Wright, 2015).

El principal AGV resultante de la fermentación de este tipo de carbohidratos es el propiónico. Este AGV se convierte en glucosa en el hígado, constituyendo la principal fuente de energía en los tejidos musculares y se transforma en lactosa a nivel de la glándula mamaria para la producción de leche (Membrive, 2016).

Las pectinas tienen un elevado contenido energético y son fermentadas rápidamente, sin embargo, a diferencia de los almidones, el acetato es el principal producto de su fermentación, lo que reduce el riesgo de acidosis (Van Soest, 1982).

Los azúcares simples (presentes en pulpas, melazas, hierbas jóvenes, etc), fermentan rápidamente por la flora sacarolítica generando butírico como AGV predominante. El butírico es utilizado principalmente por las células epiteliales ruminales (95%) y el resto (5%) va al torrente sanguíneo donde se convierte en cuerpos cetónicos (cetonas) y ácidos grasos de cadena larga en el hígado. Las cetonas están disponibles como fuente de energía para los rumiantes y, al igual que el acetato, también se convierten en triglicéridos en los adipocitos y en la glándula mamaria de estos animales (Membrive, 2016).

2.1.2.3-Fermentación de proteínas.

La proteína es un componente esencial en la dieta de los rumiantes. Este nutriente satisface las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, que pueden ser cubiertas con fuentes de nitrógeno tanto proteico como NNP, a la vez que aporta aminoácidos al animal, los cuales, pueden ser de origen microbiano o bien dietético (Egaña y Morales, 1986).

El nitrógeno utilizado por los microorganismos ruminales podemos agruparlos en dos grandes grupos: NNP (procedente de la urea y parte del alimento) y nitrógeno proteico (procedente del alimento, células de descamación epiteliales y las mucoproteínas salivares). El nitrógeno proteico se divide en una porción degradable, que aporta aminoácidos, péptidos y NH_3 a los microorganismos, y una porción no degradable, que es aprovechada directamente por el animal (Rotger, 2004) (**Figura 8**).

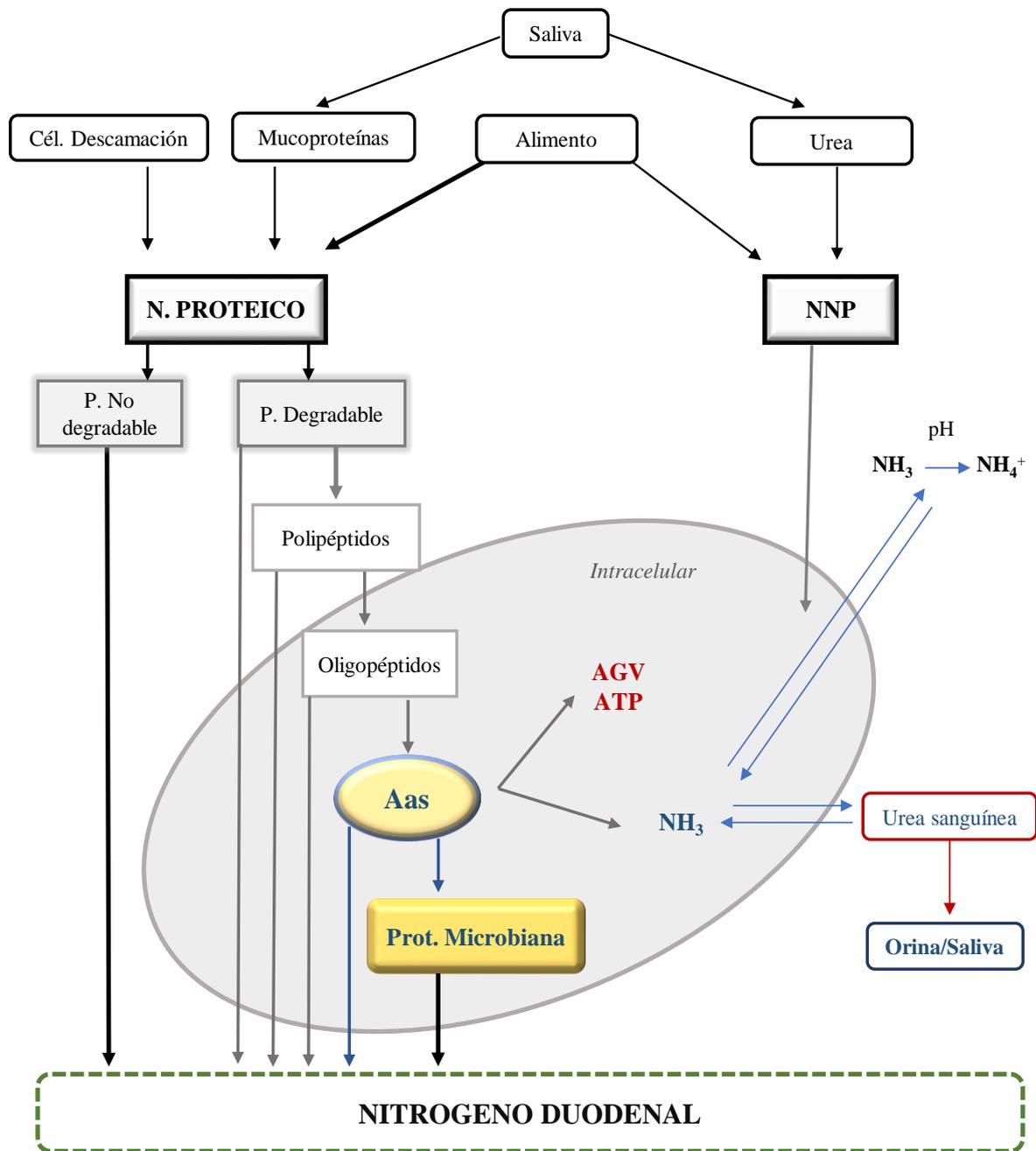


Figura 8.- Degradación y fermentación de los compuestos nitrogenados en el rumen. Síntesis de proteína microbiana. Adaptado, fuente: (Rotger, 2004).

Las proteínas son hidrolizadas en el rumen principalmente por bacterias, aunque protozoos y hongos también intervienen en el proceso, dando lugar a polipéptidos. Los polipéptidos, son degradados por las peptidasas microbianas en oligopéptidos y finalmente en aminoácidos. Los oligopéptidos son degradados intracelularmente hasta NH_3 o bien son incorporados a la síntesis proteica *ex novo*.

En cuanto a los aminoácidos presentes en el líquido ruminal, la mayoría proceden de la síntesis microbiana *ex novo* tras la degradación de los péptidos. Estos compuestos se pueden metabolizar y producir AGV, CO_2 y NH_3 (Membrive, 2016).

El NH_3 es utilizado por los microorganismos ruminales como fuente de NNP, pero cuando la concentración de NH_3 aumenta en el rumen, este pasa al torrente sanguíneo a través de las paredes del rumen, para su conversión en urea en el hígado, liberada a través de la saliva y la orina, aumentando la excreta de NNP (Owens y Zinn, 1988).

2.1.2.4-Fermentación de lípidos

Los alimentos vegetales, en general, presentan una baja concentración de lípidos, entre los que predominan galactolípidos, triglicéridos y fosfolípidos.

Estos compuestos son rápidamente hidrolizados en el rumen por las lipasas y esterases (producidas por las bacterias y protozoos). En este proceso se libera glicerol, ácidos grasos y galactosa (en el caso de los galactolípidos). El glicerol es fermentado produciendo AGV. Seguidamente, los ácidos grasos insaturados sufren un proceso de biohidrogenación. Este proceso depende de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que lleguen al rumen y del pH ruminal (Atikah *et al.*, 2018) (**Figura 9**).

Los ácidos grasos que no son biohidrogenados son incorporados al propio soma bacteriano, pasando a ser una fuente de ácidos grasos esenciales para los microorganismos, utilizados para sintetizar sus membranas plasmáticas.

Debido al pH ácido del rumen los lípidos se saponifican formando jabones insolubles de calcio y de magnesio, y esta es la forma como el 70 a 80 % de los lípidos abandonan el rumen. El resto de los lípidos llegan al abomaso como fosfolípidos, especialmente de origen microbiano.

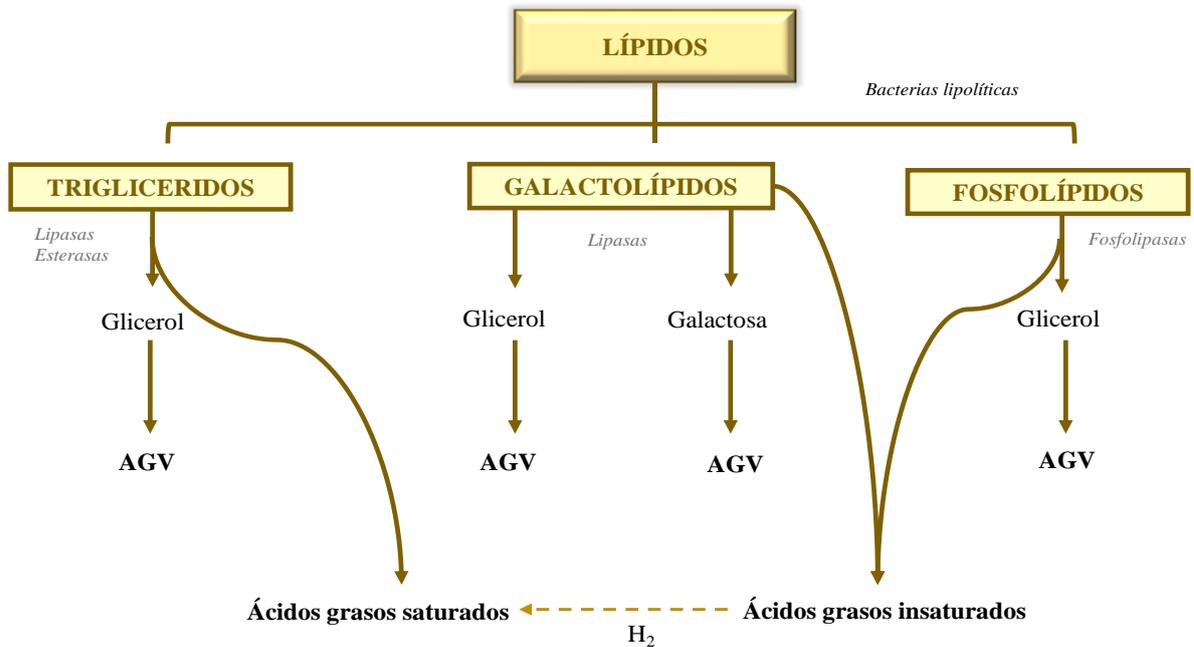


Figura 9.- Fermentación de compuestos lipídicos en el rumen. Adaptado, fuente: (Nagaraja, 2016).

2.1.2.5-Metanogénesis

La metanogénesis es un proceso fisiológico ruminal, cuya función radica en eliminar el exceso de H₂ generado durante el proceso de fermentación de los hidratos de carbono, principalmente generado en el proceso de síntesis de acetato y butirato. Las principales vías de eliminación de hidrógeno son la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados (**Figura 9**), la formación de ácido propiónico y la metanogénesis (Van Soest, 1982). Los principales microorganismos implicados en este proceso son las arqueas metanógenas, capaces de obtener energía a través de una secuencia de reducción biológica del CO₂ con el H₂ generado y formando CH₄ como producto final (Attwood y McSweeney, 2008; Liu y Whitman, 2008; Min *et al.*, 2020).

- Glucosa = 2 Piruvato + 4H
- Piruvato + H₂O = Acetato + CO₂ + 2H
- Piruvato + 4H = Propionato + H₂O
- Piruvato = Butirato + 2CO₂ + 4H
- CO₂ + 8H = CH₄ + 2 H₂O

La producción de CH₄ va a variar en función de la especie animal, el consumo de materia seca y el tipo de dieta que consuma. Todo ello influye en la eficiencia fermentativa del rumen, produciéndose un tipo de AGV u otro, y, por ende, la concentración de H₂ fluctuará.

Este gas resulta inerte tanto para los microorganismos ruminales como para el animal, siendo eliminado del rumen mediante el eructo. En la digestión del tracto digestivo posterior, también se genera CH₄, del cual, un 89% es expulsado vía respiratoria, al pasar al torrente sanguíneo a través de la pared intestinal, mientras que el 11% restante es expulsado por el ano (**Figura 10**) (De Blas *et al.*, 2008).

Además del impacto medioambiental que supone la emisión de este GEI a la atmósfera, la formación de CH₄ ruminal genera altas pérdidas energéticas que oscilan entre el 2-12% de la energía bruta del alimento que puede ser potencialmente utilizada por el animal (Hristov *et al.*, 2015; Moumen *et al.*, 2016), debido al potencial energético que presenta el CH₄ (Figuerola *et al.*, 2007).

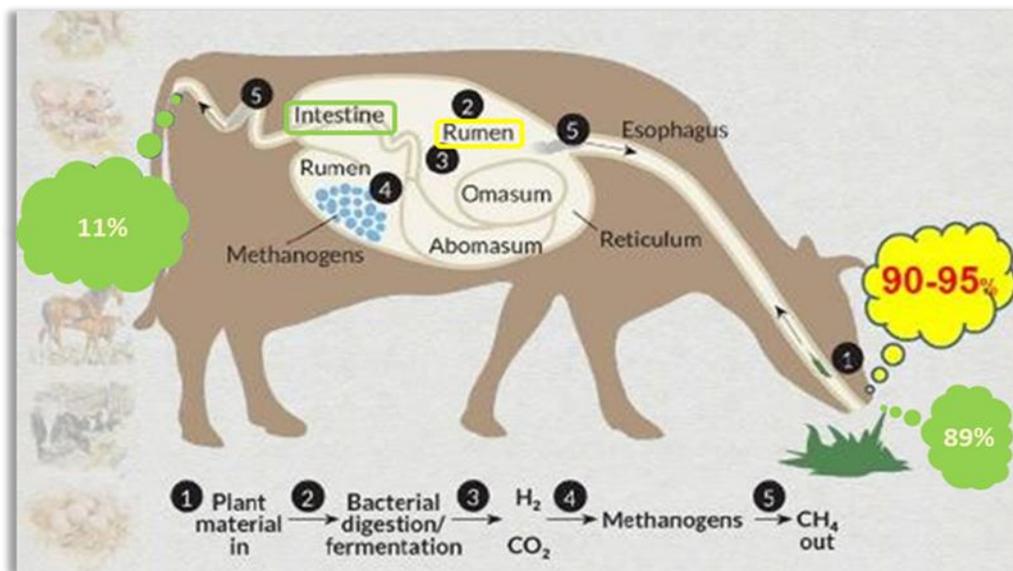


Figura 10.- Formación y excreción de CH₄ en el aparato digestivo de animal rumiante. Fuente (MAPA, 2016).

Frente a este escenario, la comunidad científica plantea diferentes estrategias con el fin de reducir las emisiones de CH₄ procedentes de la fermentación ruminal, entre ellas encontramos:

Estrategias **basadas en la dieta**

- *Aumento de la ingestión de materia seca:* el aumento de la ingestión de materia seca conlleva un aumento de la velocidad de tránsito del alimento, reduciendo el tiempo de estancia en el rumen y, por consiguiente, disminuye la fermentación ruminal y la producción de H₂, dando como resultado una disminución de la producción de CH₄ (Benchaar *et al.*, 2001; Aluwong *et al.*, 2011). Sin embargo, esta medida es un poco discutible, ya que no todos los alimentos presentan la misma velocidad de tránsito (Owens y Hanson, 1992), además, el aumento en dicha velocidad produce una reducción en la digestibilidad del alimento (McDonald *et al.*, 2010).
- *Relación concentrado/forraje:* una mayor proporción de concentrado en la dieta desencadena un aumento de la velocidad de fermentación, un descenso del pH y, una disminución del efecto tampón directo (L.A.D y pectina de la dieta) o indirecto (rumia estimulada por la presencia de partículas largas y/o groseras). Todo ello, da lugar a una proliferación de la flora amilolítica y reducción de la celulolítica, generando una mayor proporción de propiónico frente a acético, influyendo en la cantidad de H₂ liberado, y por tanto, en la formación de CH₄. Si la producción ruminal de AGV tiende a una menor producción de acetato en relación con el propionato, es decir, una relación acetato:propionato más baja, el equilibrio neto de H₂ en el rumen disminuye y reduce la formación de CH₄ (De Blas *et al.*, 2008; Aluwong *et al.*, 2011; Broucek, 2018; Min *et al.*, 2020). Este efecto ha sido demostrado por varios autores (Yan *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2014; Roehe *et al.*, 2016). La contrapartida de esta estrategia, radica en la disminución del uso de forrajes a favor de los concentrados, así como, el aumento de los costes de producción.
- *Estrategias sobre el forraje:* el consumo de forraje aumenta la producción de CH₄ ruminal debido a un mayor tiempo de permanencia en el rumen y una mayor producción de acético, aumentando la concentración de H₂ en el rumen. Sin

embargo, se ha demostrado que es posible reducir la cantidad de H₂ aplicando determinadas estrategias sobre los forrajes, como pueden ser:

- Procesamiento: el picado y peletizado de los forrajes facilita la salida del rumen y la tasa de fermentación, al mismo tiempo, da lugar a una reducción de la rumia, acidificando el contenido ruminal y reduciendo la relación acético/propiónico, ejerciendo un efecto añadido al procesado del forraje, que se traduce en una reducción de CH₄ (De Blas *et al.*, 2008). La pérdida de CH₄ por unidad de dieta puede reducirse entre un 20 y un 40% utilizando forraje molido o peletizado a altas ingestas debido a la mayor velocidad de tránsito ruminal (Shibata y Terada, 2010).
- Método de conservación: es un factor influyente sobre la cantidad de CH₄ emitido, siendo menor cuando los forrajes se ensilan que cuando son desecados. La extensa fermentación producida durante el periodo de ensilado reduce la digestión fermentativa a nivel ruminal (Shingfield *et al.*, 2002). En un ensayo realizado por Benchaar *et al.* (2001) obtuvieron una reducción del 33% de la producción total de CH₄ al sustituir heno de alfalfa por ensilado de alfalfa.
- Maduración del forraje: el consumo de forrajes jóvenes disminuye la producción de CH₄, debido a una mayor concentración de azúcares solubles y ácido linoleico. A medida que estos maduran, la concentración de hidratos de carbono estructurales aumenta (Martin *et al.*, 2010; Mirzaei y Maheri, 2016). Estudios realizados por Robertson y Waghorn (2002) mostraron que la producción de CH₄ de vacas lecheras en pastoreo, aumentaba con la madurez del forraje, de 5% a 6,5% de la ingesta de energía bruta en primavera y verano respectivamente.
- *Utilizar concentrados amiláceos de degradación lenta:* la estructura tridimensional del almidón varía según la especie y variedad vegetal, aquellos almidones con estructura muy compacta (maíz) resultan menos degradables en rumen y escapan parcialmente sin ser fermentados, disminuyendo la producción de CH₄. Esto ha sido probado por autores como Carro y Ranilla (2003), quienes encontraron una mayor producción de CH₄ *in vitro* al fermentar cebada frente al

maíz. Restrepo *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares al analizar diferentes fuentes de energía de la dieta para rumiantes, siendo la dieta que contenía maíz la menos metanogénica. Probablemente es la medida con menos contraindicaciones, en una fórmula concreta, salvo el efecto que pudiera tener el precio de un cereal frente a otro.

Actuación sobre los **microorganismos del rumen**

- *Aditivos químicos:* antibióticos ionóforos como la monensina han sido ampliamente estudiados. Estos compuestos añadidos a dietas de rumiantes se ha demostrado que mejoran la eficiencia de utilización del alimento, a la vez que, reducen la producción de CH₄ (Mathison *et al.*, 1998; Moss *et al.*, 2000). Este efecto está asociado a una la reducción selectiva de ruminococos Gram-positivos, y la proliferación de bacterias Gram-negativas, lo cual, produce un cambio en la fermentación aumentando la producción de propionato y reduciendo la formación de acetato (Boadi *et al.*, 2004). Estudios llevados a cabo por Sauer *et al.* (1998) quienes incorporaron monensina en concentraciones de 24 ppm en dietas de vacas de leche, determinaron una disminución en la producción de CH₄ de un 21% en los animales que consumían dicha dieta respecto a los animales del lote control. En este mismo estudio se observó un aumento de la producción de leche en el lote tratado. El 3-nitroxipropanol (3NOP) es otro aditivo químico con capacidad antimetanogénica, la cual, ha sido demostrada en numerosos estudios, su incorporación en la dieta de rumiantes no afecta ni a la ingestión de materia seca ni a los índices productivos (Patra *et al.*, 2017; Van Wesemael *et al.*, 2019; Melgar *et al.*, 2020).

Esta medida se ve limitada por la posible aparición de residuos en productos de origen animal para consumo humano, lo cual, lleva a ciertas restricciones legales como la retirada del uso de antibióticos en la Unión Europea desde enero de 2006 (EC 2003).

- *Vacunación del animal:* la vacunación del animal rumiante contra las bacterias metanógenas es otro enfoque para la mitigación de las emisiones de CH₄. La bovicina tiene propiedades de modificación de los microorganismos del rumen

similares a agentes antibacterianos naturales como las bacteriocinas, producidas por las bacterias ruminales *Streptococcus bovis* (Lee *et al.*, 2001). La bovicina puede inhibir la producción de CH₄ hasta en un 53% (Kobayashr, 2010). Aunque el concepto resulta atractivo, hasta la fecha hay pocas evidencias reales de la eficacia de estas vacunas contra metanógenos sobre la producción de CH₄ *in vivo* (Goopy, 2019).

- *Aditivos naturales*: estos aditivos son compuestos bioactivos presentes en plantas, subproductos, etc. Entre estos compuestos podemos encontrar saponinas, taninos, aceites esenciales, compuestos órganosulfurados y flavonoides (Patra y Saxena, 2010). Estos compuestos disminuyen la producción de CH₄ en los rumiantes, mejoran la eficiencia alimentaria y el uso de nutrientes, disminuyendo la degradación de las proteínas de la dieta (Benchaar *et al.*, 2008). Existe numerosa literatura científica que avala su acción antimetanogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Jayanegara *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

Sobre el **animal**

- *Aumento de la producción*: el aumento de la productividad animal puede ser una estrategia eficaz para reducir las emisiones de CH₄, siempre y cuando estas emisiones se cuantifiquen por unidad de producto ganadero, es decir, por kilogramo de carne o por litro de leche producido (Aluwong *et al.*, 2011; Broucek, 2018). Este aumento en la productividad individual puede conseguirse mediante métodos de selección genética, que, en el caso de animales de producción cárnica tiene como objetivo acortar los periodos productivos llegando a pesos de sacrificio a edades tempranas (Lovett y O'Mara, 2002). La mejora en las condiciones de salud, así como la mejora de los índices de fertilidad son también importantes para conseguir este objetivo.
- *Gestión genética de poblaciones microbianas*: hay evidencias de la existencia de individuos o rebaños con una población microbiana ruminal con mayor o menor capacidad metanogénica, por tanto, una selección adecuada podría generar animales con menor producción natural de CH₄ (Roehe *et al.*, 2016).

2.2.-Subproductos agrícolas: valor alimenticio, limitaciones y oportunidad frente a GEI

La labor de la actividad agroindustrial radica en la obtención, transformación y distribución de materias primas, generando en cada uno de estos procesos una serie de residuos (sólidos o semisólidos), denominados subproductos agroindustriales (Vargas y Pérez, 2018).

Estos subproductos se generan en grandes volúmenes y de manera estacional, constituyendo potentes focos de contaminación con ciertos riesgos para la salud si no son procesados de manera adecuada (Guerrero y Valenzuela, 2011). Algunos de estos residuos son quemados, liberando altas cantidades de GEI a la atmósfera, o bien, son transportados a vertederos, lo cual, supone una potente fuente de contaminación, debido a la gran masa de material con alta carga orgánica, que, dificulta el proceso de descomposición, y, a su vez, provoca la formación de lixiviados, contaminando los cursos de aguas (tanto en fuentes superficiales como subterráneas), generando malos olores con la consecuente atracción de insectos y plagas entre otros efectos negativos (Barragán *et al.*, 2008).

Debido al impacto medioambiental que supone la no gestión de estos subproductos, se han venido desarrollando diferentes alternativas con el fin de revalorizar y aprovechar estos residuos en función de sus propiedades fisicoquímicas. Entre estas alternativas se encuentran:

Elaboración de bioenergéticos: empleados para la producción de biocombustibles, como el bioetanol, biodiesel, biogás, etc. (Muñoz *et al.*, 2013). Los bioenergéticos contribuyen a la reducción del uso de los combustibles fósiles, a la disminución de emisiones de GEI y al incremento de la competitividad de la economía.

Extracción de compuestos bioactivos: tales como extractos fenólicos, fibras alimentarias, aceites esenciales, etc., presentes en muchos subproductos de esta índole. Estos compuestos pueden ser utilizados como fuente de ingredientes funcionales en diferentes alimentos debido a las propiedades saludables que presentan (Garavaglia *et al.*, 2016; Sirohi *et al.*, 2020).

Elaboración de biochar: este compuesto se origina tras un proceso de pirólisis anaeróbica de residuos agrícolas. Entre las numerosas ventajas que presenta este compuesto, destaca la mejora de la calidad del suelo, ya que estimula la actividad de microorganismos beneficiosos, aportando carbono a este (Sirohi *et al.*, 2020).

Síntesis de biopolímeros: el uso de subproductos como materia prima para la obtención de biopolímeros supone una reducción en los costos de producción, además de su utilidad en la formación de bioplásticos como alternativa al uso de plásticos derivados del petróleo (Sirohi *et al.*, 2020).

Elaboración de compost: la producción de compost puede reducir, o incluso eliminar, el uso de fertilizantes químicos, ya que tiene la capacidad de mejorar las condiciones fisicoquímicas del suelo aumentando su fertilidad (Rosas-Calleja *et al.*, 2016). Además, puede prevenir la eutrofización en diferentes fuentes hídricas, ocasionada por la escorrentía de fertilizantes utilizados en diversos cultivos.

Alimentación animal: esta medida viene practicándose a lo largo del tiempo. Los subproductos agroindustriales se caracterizan por presentar un alto contenido en materia orgánica rica en fibras vegetales, que permiten ser aprovechados por el ganado rumiante, transformándolos en nuevos productos de utilidad para los humanos (carne, leche, huevos, lana, cuero, etc.), generando una optimización de los recursos en consonancia con las nuevas tendencias que implican la utilización de una economía verde y circular (DePeters *et al.*, 2000; Condren *et al.*, 2019). Otro de los beneficios que aporta esta práctica radica en una reducción en los costes y, por tanto, un mayor rendimiento económico de las explotaciones ganaderas (DePeters *et al.*, 2000). Además, esta medida puede ser una alternativa a la temporalidad de los pastos, ya que permite cubrir parte de las necesidades nutricionales en las épocas de carestía (principalmente de junio-octubre) que se da en la región extremeña, así como, en aquellos terrenos pobres donde la productividad es escasa (Condren *et al.*, 2019; Cabo *et al.*, 2020). A pesar de ello, solo un bajo porcentaje de la producción total de subproductos generados se destina a dicho fin, debido principalmente a la falta de tipificación que dificulta su valoración nutritiva, incorporándose en piensos de mantenimiento de rumiantes

o para cubrir parte de las exigencias de fibra en dietas de conejos, aunque con intentos de su incorporación a piensos de producción (López, 2011).

Tal y como se ha citado en el apartado anterior (2.1.2.5) , una de las alternativas para reducir la metanógesis ruminal es la utilización de aditivos naturales o sustancias bioactivas presentes en plantas y/o subproductos (taninos, saponinas y aceites esenciales) incluyéndolos como parte de la dieta, debido a sus efectos sobre la fermentación y los microorganismos ruminales (Patra y Saxena, 2010; Ortiz *et al.*, 2014)

Los taninos son metabolitos polifenólicos secundarios naturales, presentes en la corteza, madera, frutos, hojas, flores y raíces de una gran variedad de plantas y subproductos.

Desde el punto de vista químico, es difícil definir los taninos ya que este término abarca oligómeros y polímeros muy diversos (Zhou *et al.*, 2011). Se podría decir que los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos de alto peso molecular que se identifican por su capacidad para formar complejos reversibles o irreversibles con proteínas principalmente, pero también con polisacáridos, alcaloides o ácidos (Frutos *et al.*, 2004; Naumann *et al.*, 2017) y por precipitar proteínas (Herderich y Smith, 2005).

De acuerdo con su estructura, los taninos pueden dividirse en dos clases de macromoléculas: taninos hidrolizables (galotaninos, elagitaninos, taninos complejos) (Yoshida *et al.*, 2000) y taninos condensados: son proantocianidinas oligoméricas o poliméricas formadas por el enlace C-4 de una catequina con el C-8 o C-6 de la siguiente catequina monomérica. Biosintéticamente, los taninos condensados se forman por la condensación sucesiva de los bloques de construcción individuales, con un grado de polimerización que varía entre dos y más de cincuenta bloques. El patrón de acoplamiento de las unidades de catequina en taninos condensados puede variar considerablemente.

La inclusión de taninos en la dieta de rumiantes puede tener un efecto perjudicial o beneficioso, lo cual, va a depender del tipo de tanino, la concentración, el peso molecular, y la estructura, así como del tipo de componentes que presente la dieta (Frutos *et al.*, 2004; Mueller-Harvey, 2006).

Los efectos perjudiciales se han observado a partir de concentraciones superiores a 50 g/Kg M.S de taninos condensados (Lee *et al.*, 1992; Silanikove *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2019) y se reflejan en:

Reducción de la ingesta voluntaria de alimento: producida por varios mecanismos; por un lado, la formación de complejos entre **los taninos y mucoproteínas** salivares o con los receptores gustativos, generan una sensación de astringencia, que aumenta la producción de saliva, reduciendo la palatabilidad e ingestión de alimentos (McMahon *et al.*, 2000). Por otro lado, un **enlentecimiento de la digestión** de la materia seca en el rumen, lo cual, perjudica el vaciado del tracto digestivo, generando signos de repleción y actuando sobre los centros nerviosos encargados del control de la ingestión (Waghorn *et al.*, 1994). El desarrollo de **aversiones condicionadas**, provocadas por los efectos negativos post-pandriales causados por estos compuestos (Launchbaugh *et al.*, 2001). En estudios realizados por Waghorn *et al.*, 1994) observaron que el consumo de 55g de taninos condensados por kg de materia seca era suficiente para reducir la ingestión de alimento en ovejas pastando *Lotus pedunculatus*.

Reducción de la digestibilidad: este efecto no se refleja por igual en todos los componentes de la dieta, siendo más claro en el caso de las proteínas (McSweeney *et al.*, 2001). Las variaciones de la digestibilidad como consecuencia de los taninos se asocian fundamentalmente con cambios en el patrón de fermentación ruminal y también con cambios en la digestibilidad intestinal posterior.

En cuanto a los efectos beneficiosos que aportan los taninos encontramos:

Mejora de la utilización proteica: debido a una reducción de la degradabilidad proteica ruminal, reduciendo el exceso de NH₃ y las pérdidas de nitrógeno, promoviendo su retención e incrementando el reciclaje de la urea en el rumen (Egan y Ulyatt, 1980; Waghorn *et al.*, 1994). Esto, sumado a una reducción de las poblaciones bacterianas proteolíticas, provoca un aumento en la absorción de los aminoácidos a nivel del tracto digestivo posterior, lo cual, se traduce en una mejora de los índices productivos (Barry y McNabb, 1999). Estudios reportados por Min *et al.* (2003), indican que los taninos presentes en varias plantas forrajeras como *Lotus corniculatus* y *Hedysarum coronarium* han dado lugar a un aumento de los niveles de producción de leche y lana, así como un aumento en la tasa de ovulación y una reducción en la carga parasitaria interna.

Reducción de la producción de CH₄ ruminal: este efecto es debido a las propiedades antimicrobianas que presentan estos taninos (Broucek, 2018; Patra y Saxena, 2010), que actúan sobre la pared celular y los enzimas extracelulares, inhibiendo el transporte de nutrientes y dificultando el crecimiento microbiano (McSweeney *et al.*, 2001). Varios estudios han evaluado la relación entre dietas ricas en taninos y la reducción de la producción de CH₄ tanto a *in vitro* como *in vivo* (Goel y Makkar, 2012; Jayanegara *et al.*, 2012; Min y Solaiman, 2018). Un metanálisis realizado por Jayanegara *et al.* (2012), donde evaluaron 30 experimentos, mostró una disminución lineal, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la producción de CH₄ con concentraciones crecientes de taninos. Recientemente, se han observado efectos positivos sobre el crecimiento de terneros (Olagaray y Bradford, 2019), debido al mayor aporte de energía neta vinculado a la disminución de la producción de CH₄.

Centrándonos en Extremadura, la agroindustria ofrece subproductos valiosos por su riqueza polifenólica, como son los derivados de la viticultura y olivicultura y, por lo tanto, con un potencial claro de actividad antimetanogénica en rumiantes. Sin embargo, en su composición abunda la estructura de pared vegetal lignificada, lo que limita su valor nutritivo. Otro limitante intrínseco es su elevado contenido en humedad, que encarece el transporte y dificulta la conservación (Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008; Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008).

2.2.1-Subproductos de la industria vitivinícola

En España, la superficie destinada al cultivo de la vid es de 964.037ha, siendo Extremadura la segunda comunidad autónoma con mayor superficie dedicada a su cultivo, con un total de 86.139ha que suponen el 2,07% de la superficie total cultivada en la región (ESYRCE, 2021). Estructurada en seis subzonas vitivinícolas (**Figura 11**) distribuidas en ambas provincias. Sin embargo, las hectáreas de terreno dedicadas al cultivo de la vid en la región han sufrido fluctuaciones a lo largo de los años (**Figura 12**), registrando un aumento de un 2,45% en el año 2021 con respecto al año anterior.



Figura 11.- Subzonas vitivinícolas de Extremadura. Adaptado, fuente: (Ribera del Guadiana D.O).

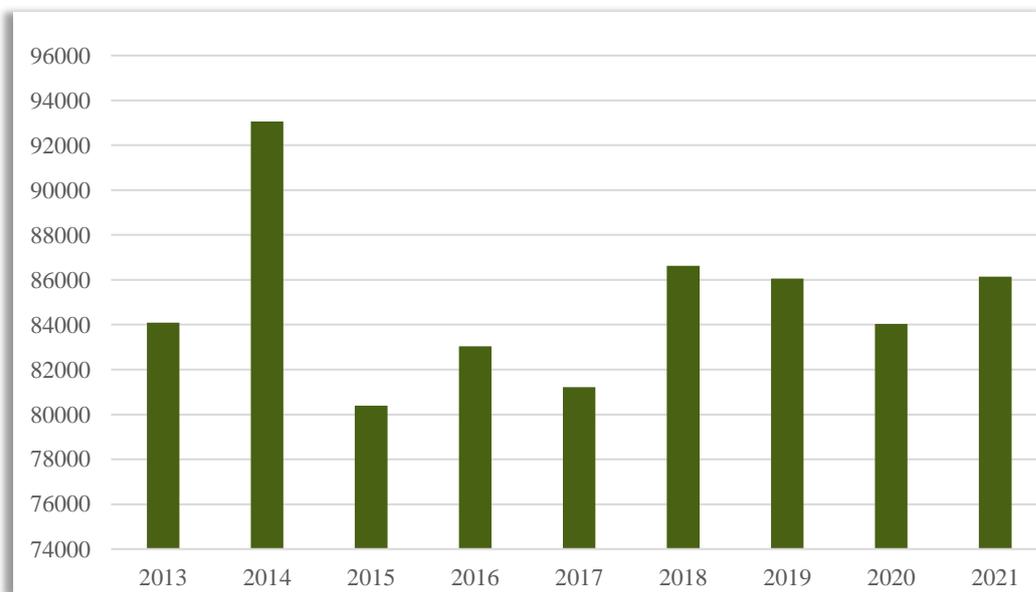


Figura 12.- Evolución de la superficie de viñedo (hectáreas) en Extremadura 2013-2021. Elaboración propia, fuente: (ESYRCE, 2019, 2020 y 2021).

Referente a la producción de caldos, según los datos aportadas por el MAPA del Sistema de Información de Mercados del Sector Vitivinícola (INFOVI, 2021), la producción de vino en España en la campaña 2020/2021 se sitúa en 40,9 millones hl, de los cuales un 6,67% de la producción procede de Extremadura, siendo la segunda región con mayor producción de vino a nivel nacional.

La uva es una fruta rica en compuestos polifenólicos con una alta importancia enológica. Estos compuestos se encuentran en diferentes partes del fruto: pulpa, piel u hollejo, tallo o raspón y semillas o granilla (**Figura 13**), y son sintetizados durante el proceso de formación de la baya y variando su concentración en función de las condiciones de cultivo y factores ambientales, tales como; la luz solar, temperatura, radiación ultravioleta y riego, siendo el estrés hídrico uno de los factores más influyentes en la concentración de taninos (Bucchetti *et al.*, 2011; Blancquaert *et al.*, 2019). Lógicamente, también influye la variedad de uva (Ortega *et al.*, 2008).

Los principales compuestos polifenólicos encontrados en las uvas son proantocianidinas (con mayor concentración en la granilla y el hollejo), antocianinas (pigmentos responsables del color del fruto y características organolépticas), flavonoles, flavanoles, resveratroles y ácidos fenólicos (Dopico-García *et al.*, 2008; Novak *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010).

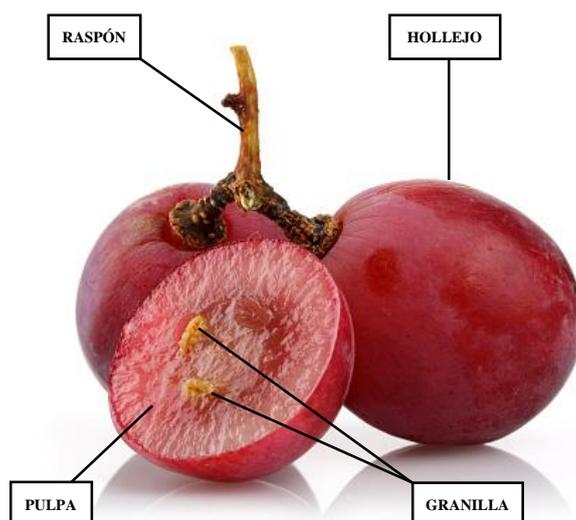


Figura 13.-Partes de la uva. Elaboración propia.

El proceso de elaboración del vino consta de varias etapas (**Figura 14**), en las que se generan una ingente cantidad de subproductos que suponen un problema de gestión para las bodegas. Los subproductos obtenidos en el procesado de la uva son los siguientes:

Escobajo o raspón: es la estructura herbácea del racimo, obtenido al inicio del proceso de vinificación, en el proceso de *despalillado*. Es uno de los principales residuos de esta industria, representando entre el 3-7% del peso del racimo. Debido a su composición química, esencialmente formada por celulosa, L.A.D, hemicelulosa y taninos, puede utilizarse para la elaboración de biocompuestos, biocombustibles y compost (Bertran *et al.*, 2004).

Orujo: es el principal residuo obtenido del proceso de elaboración del vino, está constituido por pulpa, hollejo y granilla en proporciones variables. Sus características varían notablemente en función del tipo de vino producido (tinto o blanco), la variedad de uva y del tipo de procesado. El rendimiento de este subproducto ronda en torno a 20-30kg por cada 100kg de uva procesada (FEDNA, 2016). En función del proceso enológico empleado, podemos diferenciar varios tipos de orujos (Romangosa, 1979):

Orujos vírgenes (crudos o no fermentados): obtenidos antes de que el mosto haya iniciado la fermentación. Presentan mayor riqueza nutritiva por los azúcares que no han llegado a fermentarse, incrementando así el contenido en energía. Principalmente proceden de la elaboración de vinos blancos.

Orujos fermentados: procedentes de los mostos que han fermentado con el orujo para generar vinos tintos. Presenta cierto contenido en alcohol y la industria los vuelve a destilar para recuperar el alcohol, esta práctica está regulada (UE, 2013).

Orujos destilados: son los orujos resultantes tras someterse a un proceso de extracción de alcohol. Esto se lleva a cabo mediante un método de cocción en alambiques de destilación.

Orujos lavados: tras la fermentación alcohólica, los orujos se someten a un proceso de lavado con el fin de recuperar un pequeño porcentaje de vino que contienen al salir de las tinajas o lagares de fermentación.

Debido a las características que presenta este subproducto, puede ser sometido a diferentes procesos biotecnológicos para conseguir productos con valor añadido, tales como: biocombustibles (bioetanol, biogás, biobutanol), enzimas industriales, ácidos orgánicos y compost, (Miranda *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2019; Sirohi *et al.*, 2020), también puede ser empleado para la alimentación animal (McSweeney *et al.*, 2001).

Granilla o pepita: es la semilla de la uva. Representa en torno al 4% del peso del fruto, y entre el 20-26% del orujo. La granilla está compuesta por un tegumento muy lignificado y por un albumen rico en lípidos con alto contenido en ácido linoleico y oleico. Este aceite se suele extraer debido al alto valor comercial que presenta. Principalmente se utiliza en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria por sus efectos beneficiosos para la salud (Garavaglia *et al.*, 2016). Se caracteriza por presentar un alto nivel de grasa (10-20%), un contenido proteico del 7-10% y un elevado contenido en fibra (72% F.N.D) con elevada lignificación (60% F.A.D) (FEDNA, 2016). El producto resultante de la extracción de aceite se denomina *granilla desengrasada* contiene aproximadamente un 50% de fibra bruta y entre 1-2% de extracto etéreo (FEDNA, 2016).

Lías: son los restos de las levaduras y otras sustancias sólidas que quedan en el fondo de los recipientes. Se obtienen tras el proceso del trasiego, una vez terminada la fermentación alcohólica y constituyen uno de los principales residuos orgánicos que produce la industria vitivinícola. Actualmente se procesan para obtener diferentes subproductos como alcohol, ácido tartárico y compuestos fenólicos (Sancho *et al.*, 2020; Jaso, 2021).

Este grupo de subproductos se caracterizan por presentar un alto contenido en carbohidratos fibrosos, principalmente L.A.D, siendo las proporciones de hemicelulosa y celulosa relativamente bajas (6-8 y 16-19%, respectivamente). La concentración de componentes fibrosos aumenta en el orden: hollejo<orujo<granilla desengrasada. El contenido en proteína es del orden de un 10%, sin embargo, su utilización digestiva es muy baja debido a la elevada proporción de proteína ligada a la pared celular, así como a la presencia de taninos. La digestibilidad de la proteína bruta (P.B) se sitúa en un rango de un 10-15% en rumiantes (FEDNA, 2016).

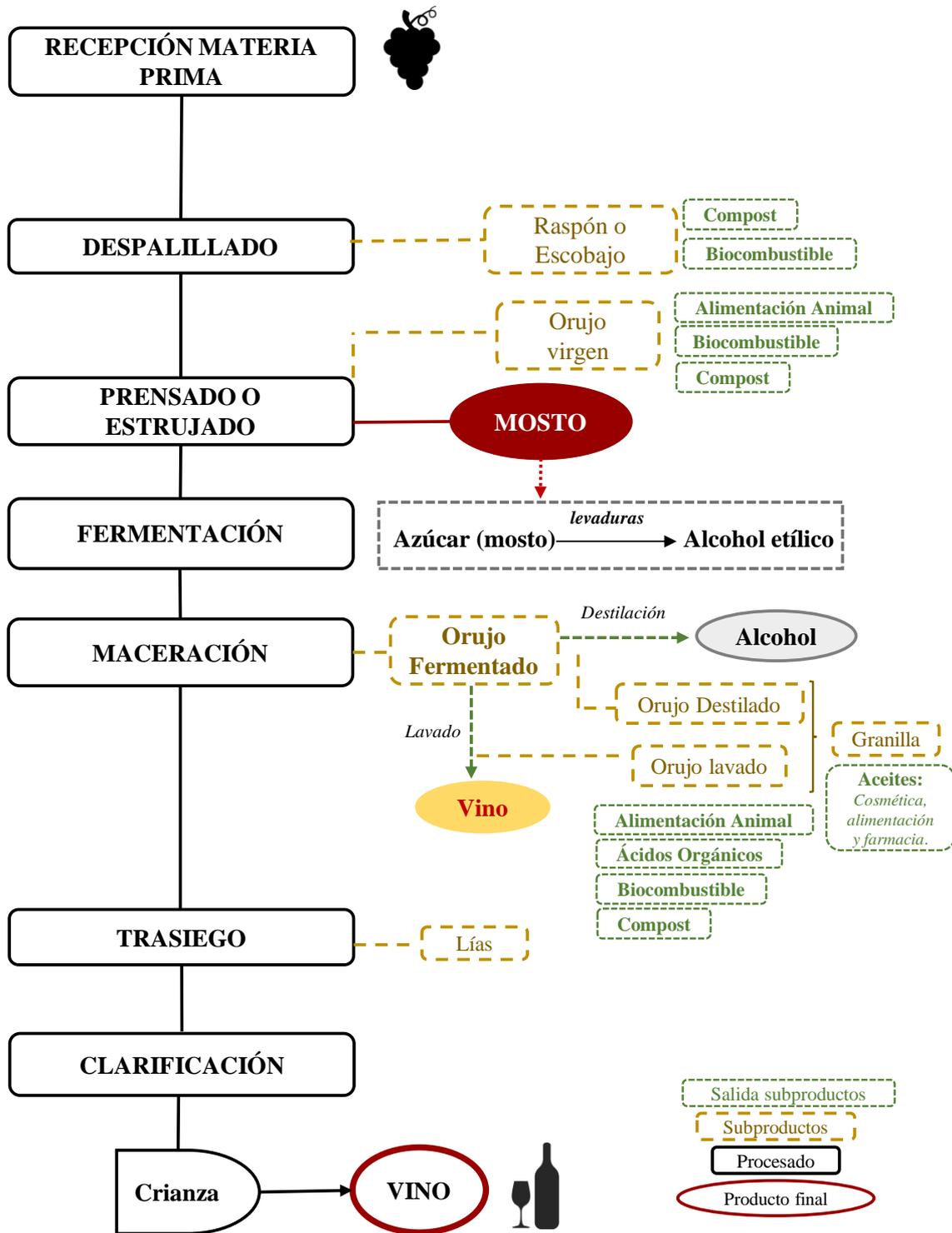


Figura 14.- Simplificación del proceso de elaboración del vino, subproductos y destinos. Elaboración propia, fuente (Rodríguez, 2002).

2.2.2-Subproductos de la industria oleica

La olivicultura tiene una gran importancia en Extremadura debido a la vasta superficie de terreno destinada a su fin, siguiendo una tendencia creciente a lo largo del tiempo, con un aumento de 17.642ha desde 2013 hasta la actualidad (**Figura 15**).

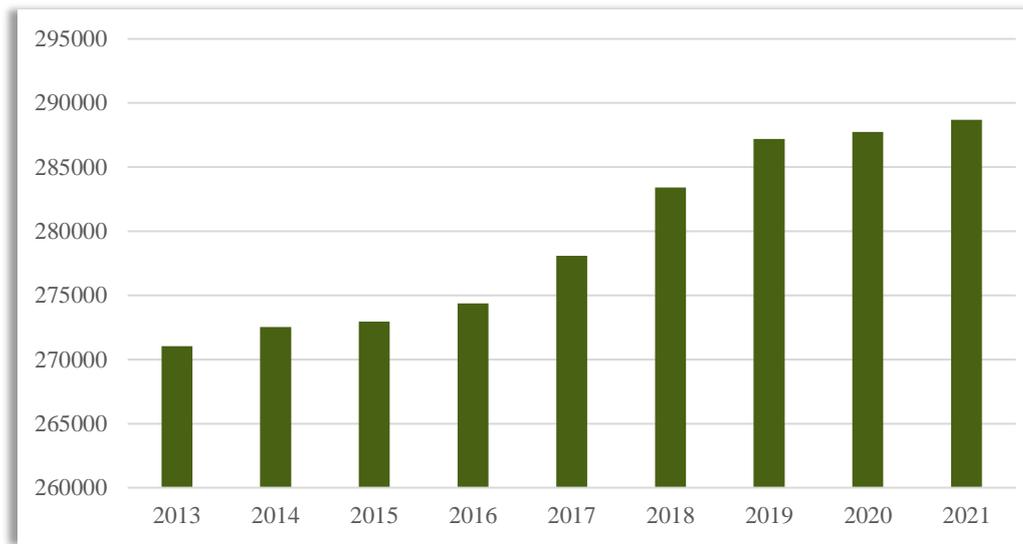


Figura 15.- Evolución de la superficie de olivar en Extremadura 2013-2021. Elaboración propia, fuente (ESYRCE, 2019, 2020 y 2021).

A pesar de que ha sido un cultivo tradicional de secano, actualmente, ocupa la segunda posición en la región en cuanto a superficie de regadío (64.176ha), sin embargo, esta nueva técnica de cultivo no ha supuesto un detrimento de los métodos de cultivo tradicionales, de forma que en la actualidad encontramos explotaciones de sistema tradicionales, junto con olivares intensivos y superintensivos o en setos. En el último informe de Encuestas sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos presentado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Extremadura registra un total de 288.692ha de olivar, ocupando el tercer puesto a nivel nacional tras Andalucía (1.673.071ha) y Castilla La Mancha (449.388ha) (ESYRCE, 2021).

En función de cuál sea el producto final deseado, la aceituna irá destinada a una industria transformadora u otra para ser sometida a diferentes procesos físicos o químicos. De este modo, tenemos aceituna de almazara, destinada la producción de aceite de oliva, cuya producción en la campaña 2020/2021 registró un total de 1.387.825,2Tn de aceite

de oliva, siendo Extremadura la tercera región, tras Andalucía y Castilla la Mancha, con mayor producción de aceite (44.894,5Tn) (SIMO, 2021).

Los métodos de transformación llevados a cabo en las almazaras han ido evolucionando a lo largo del tiempo, desde los antiguos sistemas de prensa y cachos hasta los más modernos y eficientes sistemas de extracción en dos y tres fases que actualmente se encuentran bien implantados (Hermoso *et al.*, 1996). Tras la recepción de la materia prima, se procede a realizar un lavado, molturación para obtener una pasta, batido y centrifugación para separar la parte sólida de la líquida, y así obtener el aceite. El principal subproducto obtenido en esta industria es el alperujo (mezcla de orujo y alpechín), pero también se obtienen huesos y hojín.

Por otro lado, tenemos la aceituna de mesa, cuya producción en la campaña 2020/2021 registró un total de 546.544,1Tn, siendo un 14,7% de origen extremeño (SIMO, 2021). Estas aceitunas son procesadas en las entamadoras y su transformación se consigue tras un proceso de fermentación o salazón. Los subproductos generados en esta industria son el hueso de aceituna y el hojín.

Este fruto se caracteriza por contener numerosos compuestos fenólicos, que, transferidos al aceite de oliva le confieren una serie de propiedades nutricionales, participan en el sabor y el aroma y poseen capacidad antioxidante y antimicrobiana, capaz de mejorar su vida útil y evitar las pérdidas de su calidad nutricional y sensorial durante su almacenamiento (Savarese *et al.*, 2007). Son numerosos los compuestos fenólicos encontrados en el olivo, entre ellos, los más destacados son: el ácido clorogénico, p-cumárico, ácido cafeico, oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol, luteolin-4-glucósido, heterósido del ácido cafeico, verbascósidos, rutina, glucósidos secoiridoides, etc. (Maestro *et al.*, 1994). Estos pueden llegar a constituir entre el 1 y 2% del fruto fresco. Su perfil fenólico dependerá de diversos factores como son la variedad cultivada, el clima, la zona de producción o el grado de madurez en el momento de su transformación. Por ejemplo, la concentración de oleuropeína es mayor en frutos verdes, mientras que en frutos con una coloración rosada o negra es el hidroxitirosol-4-glucósido el compuesto mayoritario (Gómez *et al.*, 2019).

En España, los residuos que se producen en el sector olivarero representan un 25% del total de residuos procedentes de la agricultura. Debido a esto, surge la necesidad de encontrar una forma de reutilizar estos subproductos (Ronda *et al.*, 2015).

Los subproductos que obtenemos tras la transformación de la aceituna (**Figura 16**) son los siguientes:

Alperujo: se trata una pasta formada por agua, aceite, piel, pulpa y hueso, obtenido tras la producción de aceite. Posee una cantidad variable de agua y aceite, dependiendo de la región donde se cultive y el método de extracción que se utilice (Nunes *et al.*, 2016). En este sentido, existen dos métodos para la transformación de la aceituna en aceite. Sistema de 2 fases y sistema de 3 fases. La principal diferencia entre ambos es la gran cantidad de humedad y el bajo contenido en aceite en el proceso de 2 fases, sin embargo, su producción es mucho más eficiente y respetuosa con el medioambiente.

Por cada 1.000Kg de aceituna se producen 500Kg de alperujo en el sistema de 3 fases, mientras que con el de 2 fases se obtienen 800Kg (Molina y Yáñez, 2008). Su composición incluye una fracción mineral, importante contenido en materia orgánica con gran cantidad de celulosa, hemicelulosa y pectinas, además de importantes niveles de lípidos, glúcidos y fenoles (Nunes *et al.*, 2016). Su elevado contenido en agua (65-70%) supone un problema para su gestión (La Cal, 2020). Su principal uso es la producción de aceite de orujo transformado en las extractoras, obteniéndose como subproductos el orujillo y el hueso de aceituna. Otra utilidad que presenta este subproducto pero que se encuentra en menor medida es su utilización como compostaje o como fuente de energía eléctrica (Callejo *et al.*, 2015).

Hoja de olivo u hojín: este subproducto es obtenido bien de la poda del árbol o bien tras la limpieza de las aceitunas antes de ser procesadas en las almazaras y entamadoras. La cantidad de hojín resultante en la producción de aceituna de mesa es menor que en la producción de aceite de oliva, esto se debe los métodos utilizados en la recolección del fruto (La Cal, 2020). Tradicionalmente, este subproducto ha sido eliminado mediante la incineración, pero desde hace unos años las hojas se han utilizado para producir compostaje (triturándose y

depositándose sobre el terreno como aporte orgánico). La leña es utilizada para fines térmicos (Berbel *et al.*, 2018). Han sido también utilizadas en la alimentación animal, concretamente en caprinos y ovinos, ya que aportan la mitad de energía y aminoácidos que requieren para cubrir sus necesidades energéticas de mantenimiento y, si se suplementa de forma correcta, podrían ser usadas como parte del forraje utilizado en su alimentación (Molina y Yáñez, 2008). El principal componente de la hoja de olivo es la F.N.D (45% como media) altamente lignificada (18% L.A.D). Una parte significativa de ésta (5-8%) corresponde a polifenoles, principalmente oleuropeína. En cuanto al nivel de proteína contienen entre un 7 y un 11%, aunque una parte importante (40%) se encuentra ligada a la pared celular, lo que, unido al alto contenido en polifenoles, resulta en una baja digestibilidad en todas las especies animales. Su contenido medio en cenizas es de un 7%, aunque varía en función de la contaminación por tierra (FEDNA, 2016).

Orujillo: obtenido durante el secado y extracción de aceite de orujo grasoso en las extractoras (Callejo *et al.*, 2015). Está formado por sólidos finos de pulpa en mayor proporción (30-50%), seguido de hueso (30-45%) y en menor cantidad por piel (15-30%) (Cruz *et al.*, 2006). Es un excelente residuo para ser usado como biomasa debido a su baja humedad (<12%) y su elevado poder calorífico (<3.800 Kcal/Kg) (La Cal, 2020), por lo que es usado principalmente como combustible durante el proceso de secado del orujo, pero también ha sido destinado para otros usos como la producción de abonos orgánicos o etanol (Ballesteros *et al.*, 2001; Cruz-Peragón *et al.*, 2006).

Hueso de aceituna: formado por una semilla, envuelta por una cáscara de madera. La obtención de éste puede ser completa (cáscara y semilla) o solo de la cáscara. El primero se obtiene por la filtración del derivado del aceite de oliva y el segundo por el deshuesado de las aceitunas de mesa (Nunes *et al.*, 2016). En España, se producen alrededor de 30 mil toneladas al año de hueso de aceituna procedentes de la producción de aceituna de mesa, y 400 mil toneladas al año generados por la industria del aceite de oliva. En cuanto a su composición química destaca como principal componente la fibra, representada por celulosa, hemicelulosa y L.A.D, pero también posee cantidades significativas de grasa y proteína (Rodríguez *et al.*, 2008).

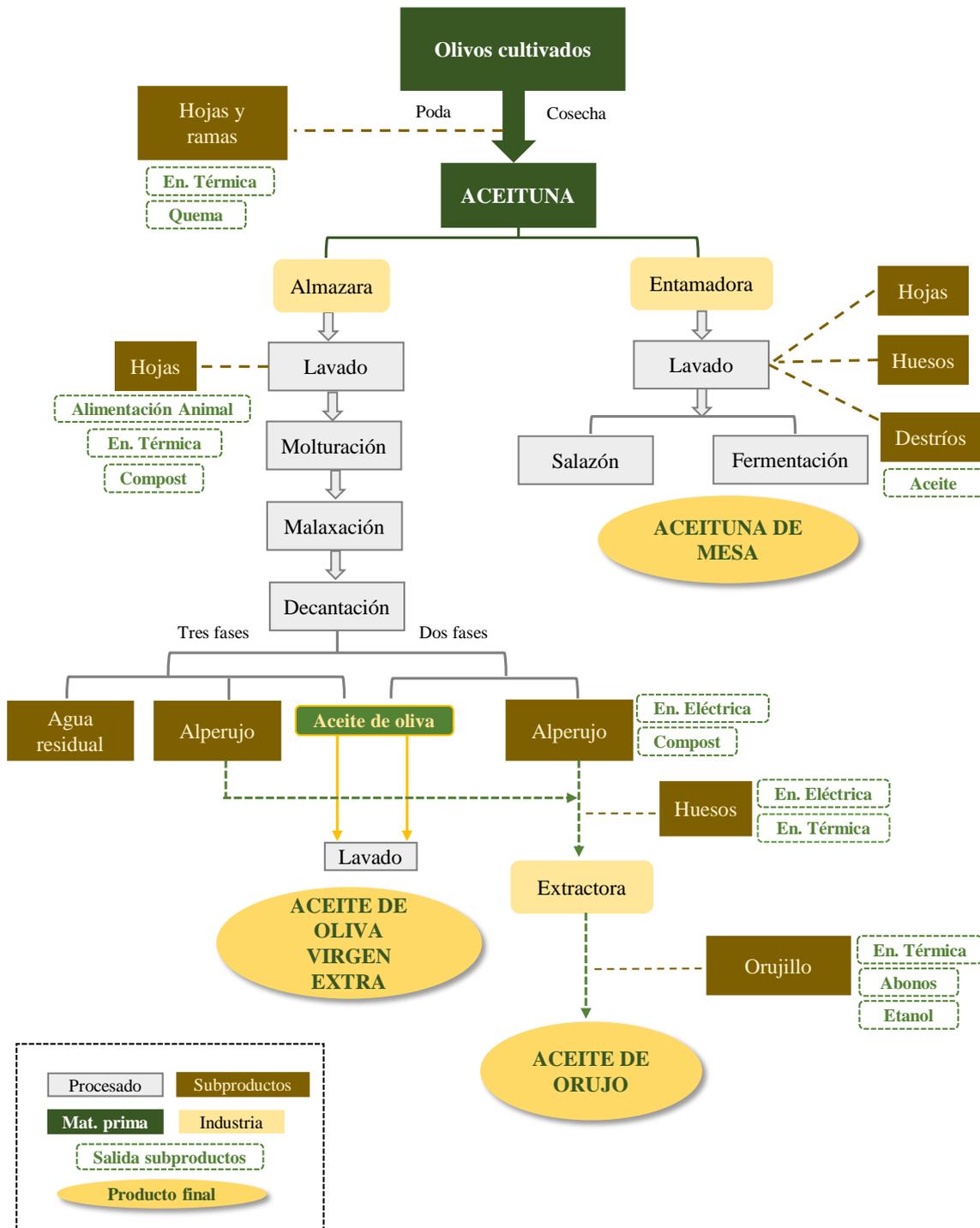


Figura 16.-Simplificación del proceso de transformación de la aceituna. Elaboración propia, fuente: (Romero-García *et al.*, 2014).

2.3.- Fermentación *in vitro* como modelo de estudio de la metanogénesis y el valor nutritivo de alimentos en rumiantes

El valor nutritivo potencial de un alimento viene determinado por su composición química (proteínas, hidratos de carbono, grasas y fibra), sin embargo, el valor nutritivo real, es decir, la cantidad de alimento realmente aprovechada por el animal tras la digestión, absorción y metabolismo viene determinada primariamente por la digestibilidad del alimento, definida como la cantidad de un alimento completo, que no se excreta en las heces y que, por consiguiente, se considera que es utilizable por el animal tras la absorción en el tracto digestivo. Se expresa en términos de materia seca (M.S) y en forma de coeficiente o porcentaje (McDonald *et al.*, 2010), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad} = (\text{alimento ingerido} - \text{heces}) * 100 / \text{alimento ingerido}$$

La determinación del valor nutritivo de alimentos destinado a la alimentación animal se ha establecido a lo largo de la historia mediante pruebas de digestibilidad empleando para ello diversos métodos (**Figura 17**).

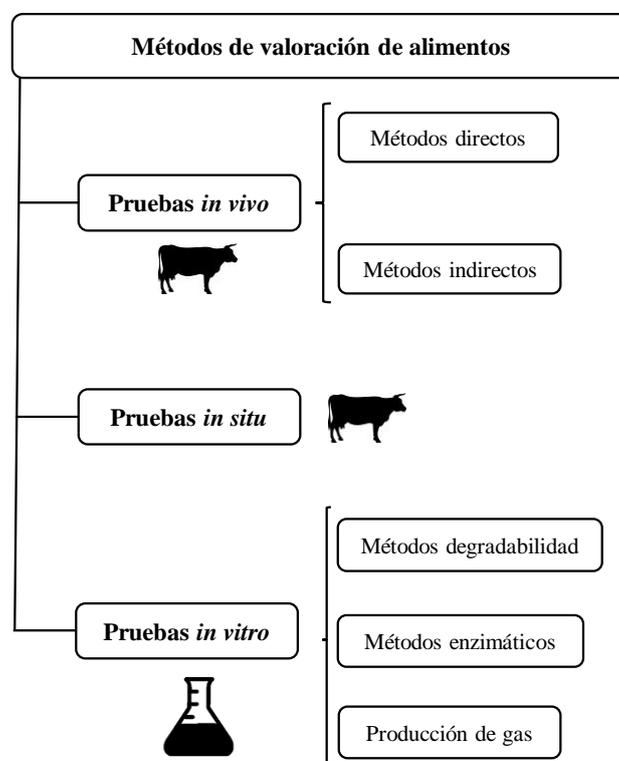


Figura 17.-Métodos empleados para la determinación del valor nutritivo de los alimentos.
Fuente: (McDonald *et al.*, 2010).

2.3.1- Valoración mediante pruebas *in vivo*

2.3.1.1. Métodos directos

Básicamente consiste en establecer un balance de la M.S y/o de sus fracciones analíticas, entre la cantidad de alimento ingerido y las heces producidas. La fracción desaparecida y, por tanto, aprovechada por el animal, se expresa porcentualmente como **Coefficiente de Digestibilidad Aparente**, ya que no tendría en cuenta el material endógeno que se elimina a través de las heces (subestimación del coeficiente de digestibilidad (CD)), ni los gases producidos en la digestión (sobreestimación del CD). En el caso de los rumiantes, su dieta se basa en un balance forraje/concentrado (proporciones variables en función del estado fisiológico del animal), por lo que es necesario realizar un primer ensayo donde se determine el CD del forraje sólo, y, posteriormente, otro ensayo donde se analicen los dos alimentos en sendos comederos, pesando la cantidad ofrecida y rehusada tanto de forraje como de concentrado. Del total de heces producidas, se resta las que se estiman que proceden del forraje (estudio previo) para conocer las provenientes del concentrado, sin tener en cuenta las posibles interacciones entre el forraje y el concentrado.

Para llevar a cabo este tipo de método, es necesario el uso de animales (4-6 animales/ lote experimental), los cuales, han de someterse a un periodo de adaptación a la dieta de estudio, que varía en función de la especie de animal, siendo en el caso de los rumiantes 20 días. Una vez transcurridos estos, pasamos a la fase experimental con una duración entre 5-7 días. Para llevar a cabo un control exhaustivo es necesario el uso de jaulas metabólicas o en su caso, el uso de arneses con bolsas colectoras de heces.

Este método se ha venido utilizando a lo largo del tiempo, sin embargo, no está exento de dificultades e inconvenientes, ya que, es un método laborioso, que consume tiempo y es difícil adaptarlo a un sistema de análisis rutinario a lo largo del tiempo (Stern *et al.*, 1997). Una alternativa más simple, al no requerir la recogida completa de las heces producidas, ni el control de ingestión diario, es la utilización de métodos indirectos.

2.3.1.2. Métodos indirectos

Estos métodos determinan la digestibilidad de un alimento a partir de la incorporación de una sustancia totalmente indigestible (marcadores indigestibles), de tal modo que, conociendo su concentración en el alimento y en una pequeña muestra de las heces podremos determinar la digestibilidad. Por ejemplo, si la concentración del indicador aumenta de 10g/kg de M.S en el alimento a 20g/kg de M.S en las heces, esto significaría que la mitad de la M.S ha sido digerida y absorbida. Este método resulta útil cuando no se dispone del equipamiento adecuado para la recolección de heces o cuando el ensayo requiera que los animales se alimenten en grupo o en situación de pastoreo siendo imposible medir la ingesta de cada animal (McDonald *et al.*, 2010).

Los indicadores pueden ser internos o naturales, es decir, forman parte del alimento y comprende sustancias tales como lignina o alcanos. También pueden ser indicadores externos, los cuales, son adicionados a la dieta o administrados de manera oral o intraruminal a los animales, siendo los más utilizados el sesquióxido de cromo, colorantes, polietilenglicol, óxido férrico, óxido crómico, tierras raras, fibra tratada y elementos hidrosolubles (McDonald *et al.*, 2010).

Estos indicadores han de cumplir una serie de características como: deben ser inertes y carecer de efectos tóxicos, no deben ser absorbidos ni metabolizados en el tracto gastrointestinal, deben carecer de volumen apreciable, deben mezclarse íntima y uniformemente con la dieta, no deben influir sobre las secreciones gastrointestinales, ni sobre la microflora gastrointestinal, deben poseer propiedades físico químicas fácilmente discernibles en la totalidad del tracto gastrointestinal, que permitan su determinación cuantitativa de forma simple y exacta.

La principal limitación que presentan ambos métodos (directos e indirectos), es la falta de información sobre la cinética de degradación ruminal, algo muy importante en el caso de los rumiantes (Kitessa *et al.*, 1999; Daza *et al.*, 2019). Debido a ello, la comunidad científica ha tratado de desarrollar métodos alternativos a este tipo de pruebas, que se pudieran llevar a cabo en laboratorio y permitieran apreciar aspectos de la dinámica digestiva con repetibilidad suficiente.

2.3.2. Valoración de los alimentos mediante pruebas *in situ*

Este método surge como primera alternativa a los métodos clásicos de digestibilidad, principalmente consiste en evaluar la digestibilidad de alimento en función de la desaparición de material de estudio, el cual, es incorporado en el interior del rumen de animales fistulados mediante bolsas de seda o nylon. Este procedimiento implica extraer las bolsas del rumen e ir pesándolas a lo largo del tiempo de incubación (0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 144h), determinando la desaparición del material de estudio. Esto permite conocer la intensidad y forma de degradación de un alimento (Mehrez y Ørskov, 1977; Kitessa *et al.*, 1999), así como elaborar modelos de cinética de degradación ruminal (Mertens, 1987).

A pesar de que ha sido una técnica ampliamente utilizada a lo largo del tiempo (Ørskov *et al.*, 1980; Madsen y Hvelplund, 1994; Kamalak *et al.*, 2005; Holt *et al.*, 2016; Pagella *et al.*, 2017) presenta una serie de problemas en su utilización, entre ellos: la falta de repetibilidad (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992), la necesidad de normalizar el tamaño del poro de las bolsas (Kitessa *et al.*, 1999) con el fin de lograr una adecuada colonización de los microorganismos ruminales al sustrato de estudio que; a la vez, evite la pérdida de muestras a través de la misma (Udén y Van Soest, 1984; Vanzant *et al.*, 1996), el efecto que ocasiona el tamaño de partícula sobre los factores previos (Damiran *et al.*, 2008), así como, la posición de las bolsas en el rumen, para lograr que todas se sumerjan en el líquido ruminal.

A todo esto, hay que sumar la necesidad de animales fistulados, implicando la aprobación de comités éticos de las instituciones de investigación y, en general, una dificultad técnica añadida por las crecientes medidas proteccionistas respecto al sufrimiento animal (Stern *et al.*, 1997; Mohamed y Chaudhry, 2008).

2.3.3. Valoración de los alimentos mediante pruebas *in vitro*

Frente a la problemática que presentan las analíticas anteriormente expuestas y, con especial énfasis, a las objeciones de base ética, se impulsó el desarrollo de técnicas alternativas que pudieran llevarse a cabo de manera integral en condiciones de laboratorio, lo que aporta ventajas objetivas (Cattani, 2011), entre ellas: no necesitan el uso directo de animales, son menos laboriosas y pueden adaptarse a pruebas con un alto tamaño muestral.

Las técnicas que más se ajustan a los retos planteados son:

- Medida de la digestibilidad de los alimentos mediante degradabilidad *in vitro* a partir de líquido ruminal (método de Tilley y Terry, 1963).
- Métodos enzimáticos (Jarrige *et al.*, 1970).
- Métodos de producción de gas (Menke *et al.*, 1979).

2.3.3.1. Medida de la digestibilidad de los alimentos *in vitro*

Este método propuesto por Tilley y Terry (1963), consiste en incubar los alimentos durante 48h en líquido ruminal tamponado y depositado en frascos de cierre hermético, seguido de otra incubación durante 48h con enzima pepsina en medio ácido.

Por otra parte, (Goering y Van Soest, 1970) propusieron una variación de dicha técnica, la cual consistía en utilizar como medio de fermentación una solución neutro-detergente, acorde con el sistema analítico propuesto por (Van Soest, 1967) para el análisis de forrajes.

Este método ha sido ampliamente utilizado a lo largo del tiempo (Marten y Barnes, 1979; Corley *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2004; Russow *et al.*, 2016), sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, entre los que pueden citarse (Cattani, 2011):

- Proporciona un único valor al final del proceso, por lo tanto, no aporta información sobre la cinética de degradación del alimento.
- Es un proceso laborioso.
- Requiere animales donantes de líquido ruminal, necesitando, animales fistulados de los que se obtiene el líquido mediante sonda, planteando nuevamente problemas éticos.

Una mejora en la capacidad de modelización del proceso ruminal de fermentación fue aportada por el dispositivo RUSITEC diseñado por Czerkawski y Breckenridge (1977). Este sistema cuenta con 8 vasos de fermentación, con la modificación de un aporte continuo de saliva artificial, para mantener el pH del medio (al igual que ocurre en un rumen en condiciones normales). A pesar de su utilidad para modelizar aspectos como la producción de ácidos grasos volátiles, el efecto de la adición de materias, varía sobre el

proceso fermentativo o estudios sobre poblaciones microbianas, su uso para el análisis rutinario de alimentos parece limitado por el trabajo y dedicación que requiere (Stern *et al.*, 1997).

Otra alternativa al método de Tilley-Terry ha sido el aparato incubador denominado Daisy-II, disponible desde el año 1997 (Tassone *et al.*, 2020). Su principal ventaja es imitar el método de Tilley-Terry trabajando simultáneamente con hasta 100 muestras, con resultados equiparables (Cismileanu y Toma, 2017).

2.3.3.2. Métodos enzimáticos

Estos procedimientos surgen como alternativa a la necesidad de utilizar líquido ruminal, con la ventaja adicional de ser un método íntegramente laboratorial, facilitando por tanto la normalización del método (Stern *et al.*, 1997).

El procedimiento básicamente consiste en incubar la muestra de alimento con celulasas de origen fúngico durante un tiempo variable (24-72h) en función del origen de la celulasa. La desaparición de M.S guarda una alta correlación con la digestibilidad *in vivo* y con los resultados de la prueba de Tilley-Terry (Marten y Barnes, 1979). Con el fin de emular una digestión completa, este método evolucionó a un ataque doble con pepsina y celulasa, resultando útil para la valoración del aporte proteico en rumiantes a partir de distintos alimentos (Aufrere y Michalet-Doreau, 1988). Esta técnica ha sido combinada con éxito con el equipo Daisy II (Gargallo *et al.*, 2006) permitiendo un análisis simultáneo de hasta 100 muestras.

A pesar de las evidentes ventajas que presenta este método, sólo sigue proporcionando un valor final de desaparición de materia, y no puede explicar nada sobre la cinética de degradación.

2.3.3.3. Métodos de producción de gas

A diferencia de los métodos *in vitro* descritos hasta el momento, este método mide la aparición de productos gaseosos volátiles, resultantes del proceso de fermentación (AGV, NH₃, CO₂, CH₄, etc.) (Blummel y Orskov, 1993).

La producción de gas tiene origen en la fermentación de los hidratos de carbono, siendo débil la asociada a proteínas y prácticamente inexistente la vinculada a grasas

(Getachew *et al.*, 1998). Por tanto, es la estructura química de los hidratos de carbono la que determina en gran medida la cinética de fermentación y la fermentabilidad final (producción de gas) (Makkar, 2004).

Los primeros estudios donde se recoge el uso de esta técnica datan de la década de los 50 (McBee, 1953), llevados a cabo mediante el uso de frascos herméticos dotados de manómetros para el control de la presión. Este método ha sido utilizado hasta nuestros días (Trei *et al.*, 1970; Jouany y Thivend, 1986; Waghorn y Stafford, 1993; Getachew *et al.*, 2005; Tagawa *et al.*, 2017), incluso se han desarrollado sistemas de registro automatizados con telemetría y grabación de datos en tiempo real (ANKOM, 2017).

Todos estos trabajos tienen en común la necesidad de diseñar algún tipo de transductor de presión que permita medir la presión generada por el gas de fermentación en el interior del recipiente. Como alternativa sencilla, surgió la idea de medir el desplazamiento del émbolo en jeringuillas de vidrio de alta capacidad (100ml nominales). El desplazamiento del émbolo es originado por la presión que ejerce el gas de fermentación, y elimina uno de los posibles problemas existentes con la técnica de los manómetros, que es el continuo incremento de presión, que puede llegar a inhibir la actividad microbiana (Theodorou *et al.*, 1994). Las primeras pruebas con jeringuillas fueron publicadas por (Menke *et al.*, 1979) y, al igual que en las alternativas previamente descritas, ha sido utilizado con profusión a lo largo del tiempo y hasta nuestros días (Blummel *et al.*, 1997; Chenost *et al.*, 2001; Sofyan *et al.*, 2017).

A pesar de todas las ventajas que presenta este sistema, sigue implicando el uso de animales donantes de líquido ruminal. Con el fin de paliar esta problemática, se planteó como alternativa el uso de heces frescas de rumiantes como fuente de inóculo. El Shaer *et al.* (1987) fueron pioneros en su uso y, posteriormente, publicaron el método, utilizando ovejas como animales donantes de heces. Con estas heces se elabora el “licor fecal” (sustituto del líquido ruminal), para ello es necesario realizar una mezcla homogénea de las heces con una solución tamponada. La sustitución del líquido ruminal por el licor fecal demostró una alta correlación entre el método propuesto y la digestibilidad real de forrajes ($r=0,98$). Posteriormente, trabajos publicados por Borba *et al.* (2001), mostraron que la producción final de gas de distintos sustratos variaba en función de la fuente de inóculo utilizada, siendo menor cuando el inóculo utilizado eran heces ovinas frente al líquido

ruminal. Resultados similares encontraron Cutrignelli *et al.* (2007) al comparar heces de búfalo y vacas con sus respectivos líquidos ruminales.

Por otro lado, Mauricio *et al.* (2001), compararon el resultado de la digestibilidad de distintos forrajes analizados mediante técnicas un *in vivo* en ovejas frente a la técnica de producción de gas con dos fuentes de inóculos diferentes, líquido ruminal y heces. Con este estudio llegaron a la conclusión que la producción de gas es menor cuando la fuente de inóculo procede de heces, si bien, la curva de fermentación es paralela a la obtenida con el líquido ruminal, avalando la utilización de heces como fuente de inóculo. Otro aspecto característico que concluyeron estos autores es que existe un retraso en la producción de gas al inicio de la fermentación al utilizar heces.

En cuanto a la comparación entre distintas especies como donantes de heces y la correlación final obtenida respecto a la digestibilidad *in vivo* en bovinos, el mejor valor se obtuvo para heces equinas ($r=0,91$), seguidas de las heces ovinas ($r=0,87$), siendo el peor resultado el de las heces bovinas ($r=0,63$) (Deneka y Canb, 2007).

Así pues, la utilización de heces como inóculo para la fermentación *in vitro* ha sido aceptado por la comunidad científica como un método válido para estimar los parámetros de fermentación (producción de gas) de forrajes y alimentos en general destinados a rumiantes (El-Meadaway *et al.*, 1998; Mould *et al.*, 2005; Pandian *et al.*, 2016).

2.3.4. Modelización de la producción de gas

La producción de gas asociada a la fermentación de un sustrato a lo largo del tiempo, representa una curva que se satura de manera asintótica (**Figura 18**), de modo que la respuesta observada de forma empírica puede ajustarse a distintos modelos, dado que, en condiciones de laboratorio, la fermentación de alimentos naturales sigue patrones más complejos que los de sustratos puros (Schofield *et al.*, 1994).

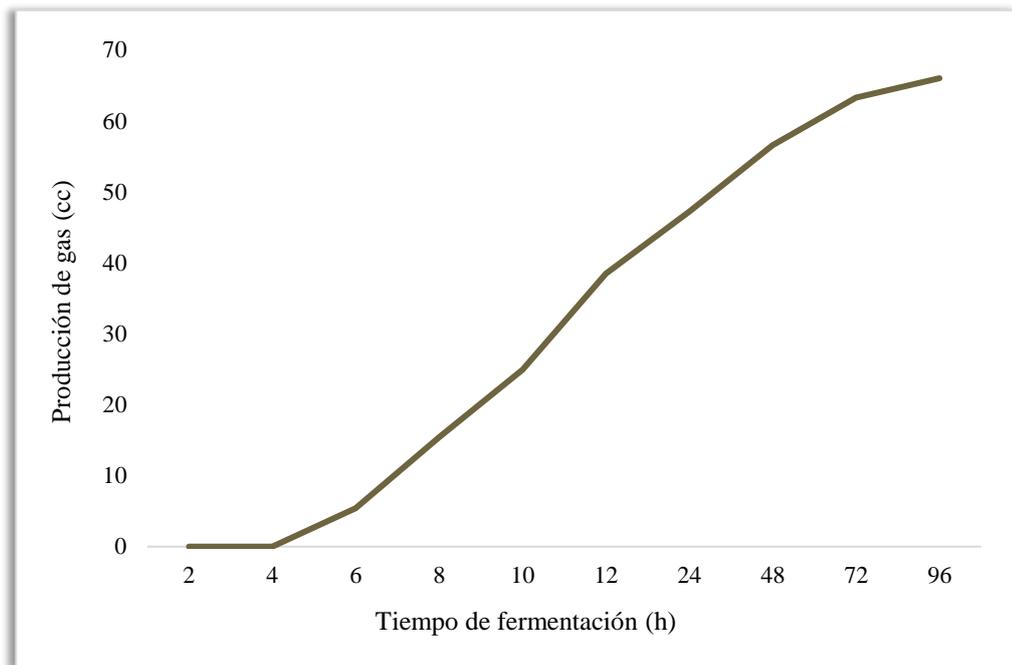


Figura 18.- Curva de producción de gas de la cebada tras proceso de fermentación *in vitro*.
Elaboración propia.

Han sido numerosas las ecuaciones propuestas para tratar de definir las tres fracciones básicas asociadas al proceso de fermentación de un alimento: gas acumulado, fracción degradable y fracción no degradable de un alimento (France *et al.*, 2000). Aunque existen muchas posibilidades teóricas, los modelos derivan básicamente de cuatro propuestas: Mitscherlich generalizado, Michaelis–Menten generalizado, Gompertz y logístico (France *et al.*, 2000). La coexistencia de varias propuestas es un indicio claro de que ninguna proporciona una solución óptima, puesto que, de otra manera, sería una la elegida.

En función de ello, los dos modelos más utilizados han sido la función exponencial propuesta inicialmente por Orskov y McDonald (1979), para definir la cinética de degradación de alimentos mediante la técnica de bolsas de nylon en rumen, adaptada a la producción de gas, en la que el porcentaje de desaparición se transforma en producción de gas (i), donde **P**, es la producción de gas al tiempo de incubación “**t**”; **a**, corresponde a la intersección de la curva de producción de gas al tiempo 0; **b** producción potencial de gas; **c**, es la constante de degradación asociada al sustrato; **t**, el tiempo de incubación.

Y, por otro lado, también está disponible la misma ecuación con un término adicional t_l (ii), que define el tiempo de *lag* o retraso en el inicio de la fermentación, como mejora aportada por uno de los propios autores previamente citados (McDonald, 1981).

$$(i) \quad p = a + b (1 - e^{-ct})$$

$$(ii) \quad p = a + b (1 - e^{-c(t-t_l)})$$

Estas ecuaciones son la base de gran número de publicaciones sobre el tema y se continúan utilizando en la actualidad: (Orskov *et al.*, 1980; Blummel y Orskov, 1993; El-Meadaway *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2001; Kamalak *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2016; Pandian *et al.*, 2016; Pagella *et al.*, 2017).

Objetivos

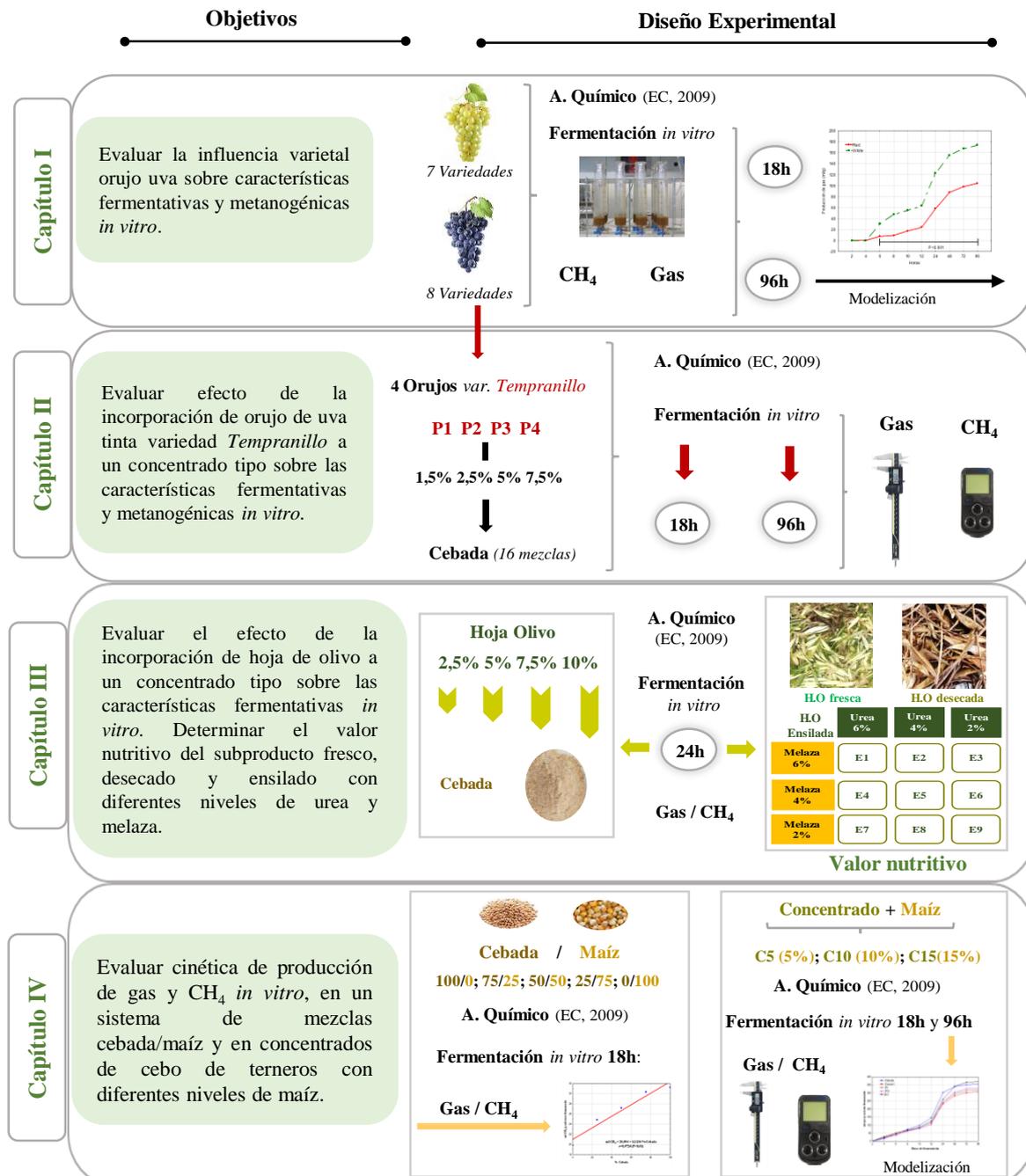
3.-Objetivos

- I.- Analizar y evaluar las características fermentativas y metanogénicas de 15 variedades del subproducto orujo de uva, con el fin de determinar la influencia varietal (blanca y tinta) y detectar aquellas variedades con mayor potencial antimetanogénico.
- II.- Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de orujo de uva tinta variedad *Tempranillo* a un concentrado tipo, sobre las características fermentativas y metanogénicas *in vitro*.
- III.- Determinar el efecto que ejerce la incorporación de diferentes concentraciones de hoja de olivo, sobre las características fermentativas y metanogénicas *in vitro* de un concentrado tipo (cebada). Así como, determinar la producción de gas, metano y valor nutritivo de dicho subproducto fresco, desecado y ensilado con diferentes concentraciones de urea y melaza.
- IV.- Determinar el efecto que ejerce la inclusión de diferentes porcentajes de maíz sobre la cinética de producción de gases y la producción de metano *in vitro* en un sistema de mezclas cebada/maíz, así como, en un concentrado de cebo de terneros con diferentes niveles de incorporación de este cereal, para determinar si la mayor presencia de maíz altera el comportamiento fermentativo y/o ejerce algún efecto sobre la producción de metano.

Material y métodos

4.-Material y métodos

La presente tesis doctoral se estructura en cuatro capítulos enfocados principalmente en la evaluación *in vitro* de diferentes estrategias nutricionales orientadas a reducir las emisiones de CH₄ ruminal, y cuyo diseño experimental se presenta de manera resumida en el siguiente esquema.



4.1.-Preparación de muestras

Todas las materias primas analizadas fueron procesadas con el fin de garantizar un muestreo homogéneo y facilitar los diferentes procesos analíticos. Para ello, los subproductos con cierto grado de humedad fueron desecados en una estufa de ventilación forzada (Indelab-DIL FI720) a 65°C durante un periodo de 72h.

Tras su desecación, se molieron en un molino ciclónico (Retsch ZM200) con tamiz de 1mm de diámetro, obteniendo un polvo fino (**Imagen 1**). La elaboración de mezclas entre diferentes materias primas (subproducto + concentrado; concentrado amiláceo + concentrado harinoso) se llevó a cabo mediante una amasadora (Taurus Prima Complet Batidora, 300W), tras haber realizado pruebas previas para determinar el tiempo óptimo de mezcla (**Imagen 1**).



Imagen 1.- Materias primas procesadas. Elaboración de mezclas.

4.2.-Elaboración de ensilados

Para la elaboración de los ensilados experimentales, se procedió a pesar 325g del subproducto fresco y posteriormente se le incorporó con un aspersor manual una solución de urea-melaza en diferentes concentraciones (calculadas en base a la M.S del subproducto). Se le incorporó agua hasta alcanzar una humedad final del 30%. Posteriormente se procedió al mezclado manual hasta que todo el material quedó bien impregnado. Finalmente fueron envasados doblemente al vacío (envasadora Besser vacuum blizzard) en bolsas de 35x20cm y 40x30cm, asegurando una anaerobiosis total, donde permanecieron durante un periodo de 42 días a temperatura ambiente.



Imagen 2.- Ensilado experimental.

4.3.-Análisis químico

La determinación de la composición químico-nutritiva de las materias primas de estudio se llevó a cabo siguiendo los procedimientos oficiales descritos para alimentos destinados a consumo animal, publicados en el reglamento EC 152/2009 (EC, 2009). En primer lugar, se analizaron los diferentes principios inmediatos mediante análisis de WEENDE, el cual establece los siguientes conceptos (**Figura 19**).

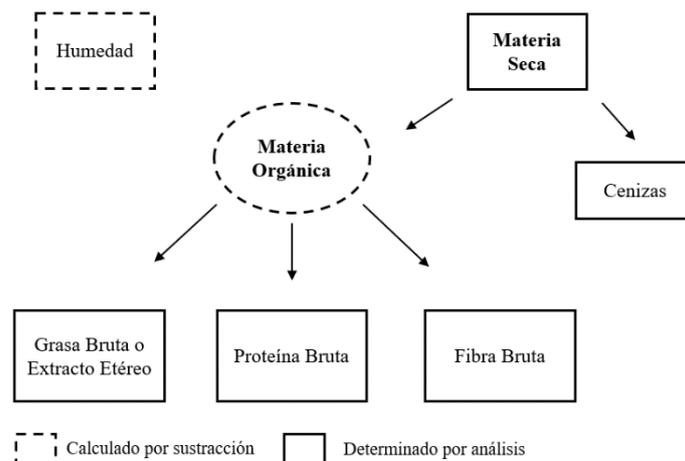


Figura 19.-Análisis inmediato o esquema de partición de Weende. Elaboración propia, fuente: (EC, 2009)

De manera resumida, los procedimientos son los siguientes:

Humedad (H): calculada como porcentaje de pérdida de peso hasta peso constante, tras desecación de la muestra a 100°C en estufa (Selecta 210). El contenido en M.S es el complemento a 100 de la H.

Ceniza Bruta (C.B): este procedimiento consiste en realizar una incineración de una muestra conocida en un Horno Mufla a 550°C (Carbolite ELF 11/6). Tras esta incineración se realiza el pesado del residuo. El contenido en Materia Orgánica (M.O) se obtiene restando el contenido en cenizas al total: $\% M.O = 100 - \% C.B.$

Extracto Etéreo (E.E) o Grasa Bruta (G.B): la determinación de la G.B se realizó mediante la técnica *Soxhlet*. Esta técnica consiste en realizar sucesivos lavados de la muestra con éter de petróleo, consiguiendo así, arrastrar el contenido liposoluble de la muestra. Para ello, se utilizó un sistema automatizado de calefacción y lavado (Raypa Soxtest de 6 plazas), el residuo, finalmente fue pesado y expresado como porcentaje del material original.

Proteína Bruta (P.B): se determinó mediante la técnica *Kjeldhal* (obtiene el nitrógeno total del alimento). Se llevó a cabo en tres fases semiautomatizadas por sendos aparatos:

- Digestión, tras un ataque con ácido sulfúrico en caliente (440°C), (digestor Gerhardt Kjeldatherm de 24 plazas). El contenido nitrogenado de la muestra se transforma en sulfato amónico.
- Destilación, a la disolución de sulfato amónico obtenida se le añade hidróxido de sodio (NaOH), produciéndose NH₃ y vapor de agua. Seguidamente, el NH₃ se destila y el nitrógeno es recogido en una solución de ácido bórico (destilador automático Gherhardt Vapodest).
- Titulación, consiste en la valoración del nitrógeno previamente obtenido y fijado. Se lleva a cabo con ácido clorhídrico (HCl) 0,1N. Para transformar el nitrógeno destilado en P.B se usa el factor de conversión 6,25 calculándose como: $\% P.B = \% \text{Nitrógeno} \times 6,25.$

Fibra Bruta (F.B): esta técnica consiste en someter a la muestra a un doble ataque con ácido sulfúrico y potasa diluidos (Digestor Selecta DosiFiber de 6 plazas), posteriormente se incinera en un horno Mufla a 550° C (Carbolite ELF 11/6).

Por otra parte, para poder cuantificar con mayor precisión la fibra total de las muestras de especial interés en alimentos destinados a rumiantes, se determinó mediante el método Van Soest (1967):

Fibra Neutro Detergente: es el residuo remanente tras la realización de un ataque con una disolución de detergente (lauril sulfato de sodio) a pH neutro, en un digestor Selecta DosiFiber. Esta fracción representa la fibrosidad general del alimento y está relacionada con componentes de mayor volumen y menor digestibilidad localizados en la pared celular vegetal.

Fibra Ácido Detergente: es el residuo remanente tras la realización de un ataque con una disolución a pH ácido con el detergente bromuro de cetiltrimetilamonio en un digestor Selecta DosiFiber. Esta fracción representa la fibra no aprovechable por vía fermentativa y está relacionada con componentes de baja digestibilidad y largo tiempo de retención en el tracto gastrointestinal (estructura de pared de alta lignificación, minerales).

4.4.-Fermentación *in vitro*: producción de gas

Para llevar a cabo el proceso de fermentación *in vitro*, se siguió el protocolo descrito por Menke *et al.* (1979) también conocido como método de Hohenheim, universidad alemana del dicho autor. Para ello, se utilizaron jeringas de vidrio con punta tipo Luer de 120ml de capacidad total provistas de una válvula de tres vías (**Imagen 3**). Estas válvulas permiten cerrar herméticamente la jeringa, manteniendo las condiciones óptimas de anaerobiosis, así como, conectar a otros dispositivos a través de sus conexiones tipo Luer.



Imagen 3.- Jeringa 120ml con punta tipo Luer, válvula de 3 vías.

El procedimiento consta de una serie de pasos:

Fabricación de saliva artificial: elaborada a partir de la mezcla homogénea de cuatro soluciones (Aghajanzadeh *et al.*, 2015) descritas en la **Tabla 2:**

- 237ml de *solución macromineral*
- 237ml *solución tampón*
- 0,12ml *solución micromineral*
- 49,5ml *solución reductora*
- 1,22ml *Resazurina* (indicador de pH)
- H₂O destilada hasta ajustar a un volumen final de 1l.

Tabla 2.- Reactivos bases, elaboración de la saliva artificial.

Tipo de Solución	Reactivos
<i>Macromineral</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 5,7g Fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄) - 6,2g Fosfato potásico monobásico (KH₂PO₄) - 0,6g Sulfato magnésico heptahidratado (MgSO₄ 7H₂O) - Completar con agua destilada hasta 1l
<i>Tampón</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 39g Bicarbonato sódico (NaHCO₃) - Completar con agua destilada hasta 1l
<i>Micromineral</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 13,2g Cloruro cálcico bihidratado (CaCl₂ 2H₂O) - 10g Cloruro magnésico tetrahidratado (MnCl₂ 4H₂O) - 1g Cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl₂ 6H₂O) - 0,8g Cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃ 6H₂O) - Completar con agua destilada hasta 100ml
<i>Reductora</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 47,5ml agua destilada - 2ml NaOH - 285mg Sulfuro sódico heptahidratado (Na₂S 7H₂O)

Para la elaboración de la mezcla se utilizó un agitador magnético calefactable (Selecta- Agimatic-ND) a 900 r.p.m durante 45 minutos, hasta que el indicador viró,

pasando de morado-rosa fuerte a rosa grisáceo (**Imagen 4**) y a una temperatura de 39°C, con el fin de evitar un choque térmico al comienzo de la incubación.



Imagen 4.- Elaboración de saliva artificial.

Fabricación del licor fecal o inóculo de la fermentación: para su elaboración se emplearon 100g de *heces frescas de ovino* (El Shaer *et al.*, 1987) (recogidas directamente del recto del animal y justo al momento de la puesta a punto del método) + 600ml de *saliva artificial*. Ambos componentes se mezclaron de manera homogénea con ayuda de una batidora de mano y saturando la mezcla continuamente con CO₂, con ello conseguimos mantener un pH ligeramente ácido (6,8 aproximadamente). Posteriormente se filtró mediante gasas evitando el paso de partículas groseras al licor fecal (**Imagen 5**).



Imagen 5.- Fabricación de licor fecal.

Proceso de fermentación: para la puesta a punto de la fermentación se dispusieron diferentes juegos de jeringas ordenadas, numeradas y distribuidas en grupos de 12 jeringas cada uno.

En cada grupo, las dos primeras jeringas (1 y 2) contenían 30ml de licor fecal, actuando como blanco. Esto nos permite conocer la producción de gas asociada al material fecal y restarla a los resultados finales, reduciendo la variabilidad originada por el inóculo.

Las jeringas 3 y 4, constituyeron el control, 30ml de licor fecal + 0,2g de cebada, o alfalfa (en función de la materia prima de estudio). El control nos permite obtener un patrón continuo y corregir la posible variabilidad de cada proceso fermentativo.

Las ocho jeringas restantes (5 al 12), contenían el sustrato de estudio: 30ml de licor fecal + 0,2g de sustrato de estudio.



Imagen 6.- Jeringas con inóculo y sustratos, previa incubación.

Las jeringas fueron incubadas en una estufa (SELECTA Digitheat) a 39°C controlando la temperatura mediante un termómetro de sonda de tipo TFA de -40 a 200°C. El tiempo de incubación de las muestras varió en función de los objetivos específicos de cada estudio, de tal modo que:

- Para la determinación de la *cinética de fermentación*, las muestras se incubaron por un periodo de 96h, siguiendo el protocolo ordinario planteado por El-Meadaway *et al.* (1998); Rasouli y Amiri (2016), anotando el desplazamiento del émbolo a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, y 96 horas.
- Para determinar el *potencial de fermentación* de sustratos concentrados, el tiempo de incubación fue de 18h, anotando el desplazamiento al inicio y al final del periodo de incubación (0 y 18h) (Damiran y Yu, 2010).
- Para determinar el *valor energético* de un sustrato el periodo de incubación fue de 24h. El avance del émbolo se anotó a las 0 y 24h (Menke y Steingass 1988; Krishnamoorthy *et al.*, 1995).

La producción potencial de gas se obtuvo midiendo la distancia entre las marcas anotadas en los espacios temporales especificados anteriormente. Para ello, se utilizó un calibre digital (Absolute Digimatic Mitutoyo). La producción potencial de gas finalmente se expresó como *ml/g de sustrato fermentado*.

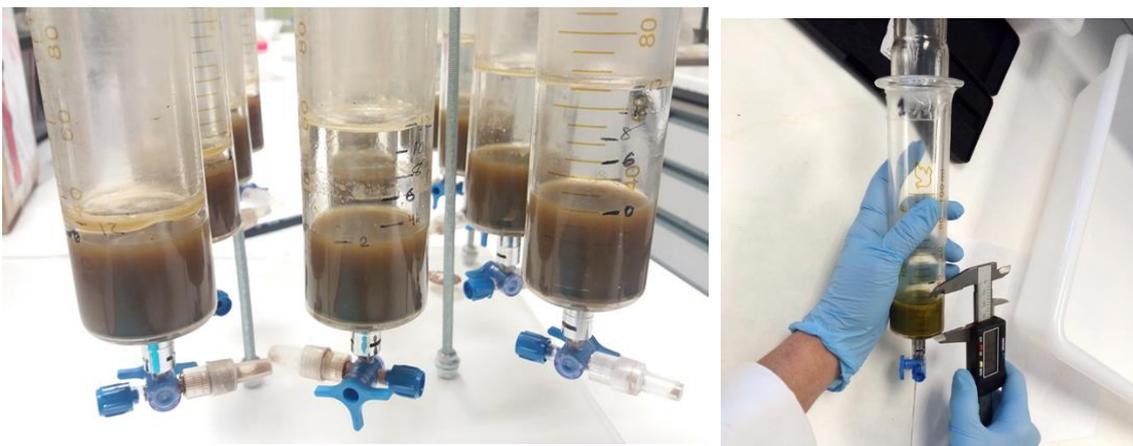


Imagen 7.- Medida de la producción de gas tras 12h de fermentación.

4.5.-Modelización cinética de producción de gas

La curva de producción de gas se modelizó siguiendo las ecuaciones propuestas por Orskov y McDonald (1979)(i) y McDonald (1981)(ii):

$$(i) \quad p = a + b (1 - e^{-ct})$$

$$(ii) \quad p = a + b (1 - e^{-c(t-t_l)})$$

p = producción de gas acumulada a tiempo de incubación t.

a = intersección de la curva de producción de gas a tiempo 0.

b = producción potencial de gas.

c = constante de degradación asociada a un sustrato.

t = tiempo de incubación.

t_l = tiempo de latencia en el inicio de la fermentación.

Los parámetros de la ecuación se ajustaron mediante programación Solver, en Excel, minimizando la diferencia de cuadrados entre los datos reales y ajustados al variar las constantes de la ecuación (a, b, c, t_l).

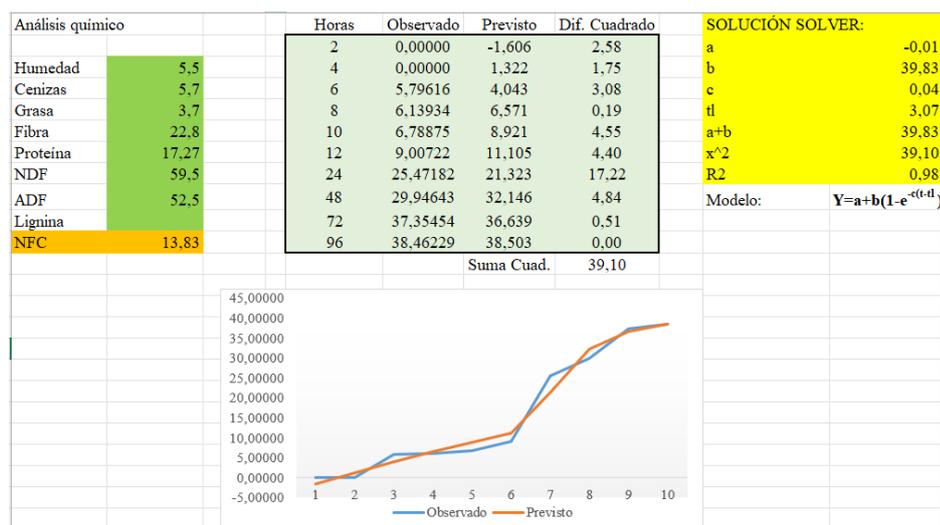


Imagen 8.-Modelización automática de la producción de gas.

4.6.-Predicción del valor energético

El valor energético se estimó a partir de los resultados de composición química y producción de gas *in vitro* tras 24h de incubación, aplicando las ecuaciones propuestas originalmente por Menke y Steingass (1988), convenientemente contrastadas en otras publicaciones de su equipo de investigación (Krishnamoorthy *et al*, 1995), y adaptadas específicamente al tipo de sustrato utilizado, en este caso un subproducto. Se calculó la energía metabolizable (EM) (iii) expresada como *Mcal/kg m.s* y el porcentaje de digestibilidad de la materia orgánica (%DMO) (iv).

$$(iii) \quad EM = (1,06 + 0,1570P.G + 0,0084P.B + 0,022G.B - 0,0081C) / 4,184$$

$$(iv) \quad \%DMO = 0,9991PG + 0,0595PB + 0,0181C + 9$$

P.G = producción de gas tras 24h de fermentación (ml gas / 0,2mg).

P.B = contenido de proteína bruta (g/kg m.s).

G.B = contenido de grasa bruta (g/kg m.s).

C= contenido de cenizas (g/kg m.s).

4.7.- Determinación de CH₄

La determinación de CH₄ se llevó a cabo una vez culminado el periodo de fermentación (18, 24 o 96h). Para ello, se empleó el detector específico de gas CH₄ (GMI-PS200) previamente calibrado y certificado por el fabricante. Este equipo fue conectado a un circuito cerrado de gases, elaborado en la Unidad de Nutrición Animal de la UEx, formado por dos vías que comunican la jeringa de estudio y el detector de CH₄ con un frasco colector (**Imagen 9**).

Para llevar a cabo el proceso, el gas formado en el interior de la jeringa se traspa al frasco colector a través de la vía que los conecta, controlado a su vez por una válvula

de tres vías, que permite su cierre hermético tanto de la jeringa como del frasco colector impidiendo que el gas escape al exterior.

Posteriormente se acciona el detector de CH_4 , que, mediante la bomba de aspiración, succiona el gas del interior del frasco y mide el porcentaje de CH_4 presente en el volumen total de gas producido. Los resultados se expresaron como *ml CH_4 /g de sustrato fermentado*.

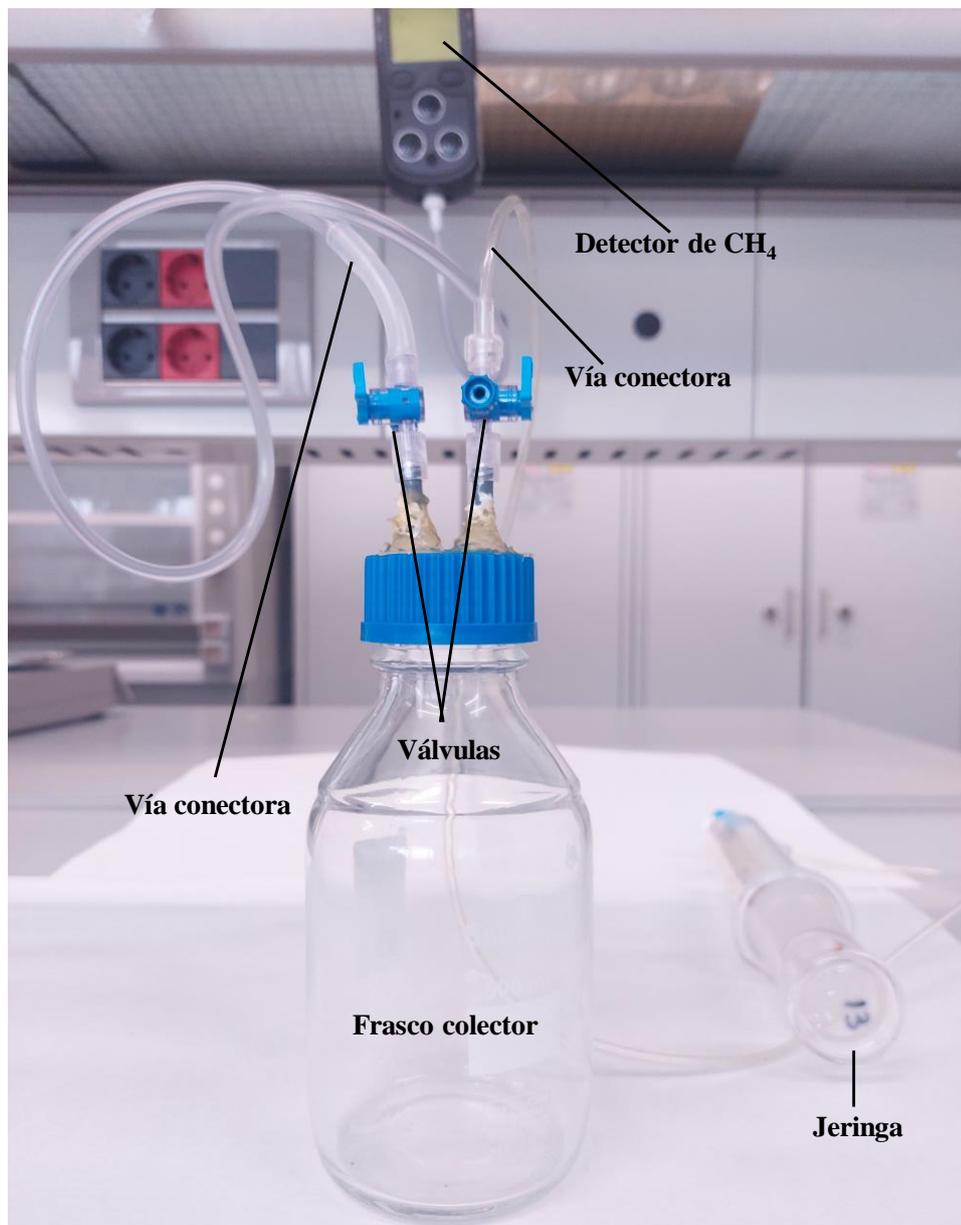


Imagen 9.- Circuito cerrado de gases.

4.8.- Análisis estadístico

Los análisis estadísticos concretos se han descrito en cada uno de los trabajos. Como norma general, se han utilizado los siguientes procedimientos estadísticos:

Las variables determinadas, se han descrito mediante su media y desviación típica. La posible existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se ha determinado mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En el caso de existir estas diferencias, los grupos de medias diferentes ($p < 0,05$) se establecieron mediante una prueba de Dunn.

En su caso, los modelos de regresión se llevaron a cabo mediante la hoja de cálculo Excel.

La cinética de producción de gases en función del tiempo, se ajustó a sus respectivos modelos (Orskov y McDonald, 1979; McDonald, 1981) programando una hoja Excel para minimizar las diferencias cuadráticas al modificar los parámetros generales de cada ecuación, mediante la función Solver (**Imagen 8**).

Finalmente, en el caso del ensilado de hojas de olivo, se abordó un ANOVA factorial con el fin de detectar el posible efecto ocasionado por los diferentes niveles de urea y melaza. En el caso de detectar diferencias ($p < 0,05$) se realizó una prueba de Tukey *a posteriori*.

El programa utilizado, además de Excel, ha sido el SPSS con licencia de la UEx.

Resultados y discusión

Capítulo I

*Efecto de la variedad de orujo de uva sobre
la producción de gas y metano in vitro*

Archivos de Zootecnia, 70 (269): 34-41. 2021

<https://doi.org/10.21071/az.v70i269.5416>



Efecto de la variedad de orujo de uva sobre la producción de gas y metano *in vitro*

Barraso, C.¹; López-Parra, M.M.¹ and Rodríguez, P.L.²

¹Departamento de Calidad de Carnes. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Badajoz. España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres. España.

SUMMARY

El metano es un gas de efecto invernadero que contribuye potencialmente al cambio climático. Los rumiantes, debido a las características de su sistema digestivo, son capaces de digerir la fibra mediante el proceso de fermentación ruminal, en el cual se generan gases como el metano. Los polifenoles presentan capacidad para inhibir la producción de dicho gas. Estos compuestos están presentes en distintas plantas y subproductos agroindustriales, como el orujo de uva, cuya inclusión en la dieta de corderos podría dar lugar a una disminución de las emisiones de metano entérico. Por tanto, el objetivo de este estudio, ha sido evaluar la cinética de producción de gas, así como la producción de metano de 15 variedades de orujos de uva (blancos y tintos), con el fin de seleccionar aquellas variedades que sean menos metanogénicas y poder incorporarlas en el pienso de cebo de corderos. Para ello, se ha empleado la técnica de producción de gas *in vitro* en dos periodos de fermentación diferentes, 18 y 96 horas. Los resultados obtenidos para la producción de gas a 18 y 96 horas en los orujos tintos han sido de 59.77-104.28 ml/g y para los blancos 94.44-173.23 ml/g respectivamente. En cuanto a la producción de metano en orujos tintos obtuvimos 3.72-6.79 mCH₄/g frente a 9.66-26.08 mCH₄/g producidos por los orujos blancos. Por tanto, se observa un mayor potencial inhibidor de la producción de gas y metano por parte del grupo de orujos tintos frente al de los orujos blancos.

In vitro gas and methane production by grape pomaces, influency of variety

RESUMEN

Methane is a greenhouse gas that potentially contributes to climate change. The characteristics of the digestive system of ruminants enable them to digest fibre by ruminal fermentation, generating gases such as methane. Polyphenols have the ability to inhibit the production of this gas. These compounds are available in different plants and agro-industrial byproducts, such as grape pomaces, whose inclusion in diet of lambs could cause a decrease in enteric methane emissions. Therefore, the aim of this study was to evaluate the kinetics of gas production, as well as the production of methane from 15 varieties of grape pomace (white and red), in order to select those varieties with less methanogenic characteristics and include them in lamb feed. To this purpose, the *in vitro* gas production technique has been used in two different fermentation periods, 18 and 96 hours. The results obtained for gas production at 18 and 96 hours in red pomaces were 59.77-104.28 ml/g and for white pomace 94.44-173.23 ml/g respectively. In terms of methane production in red pomaces we obtained 3.72-6.79 mCH₄/g compared to 9.66-26.08 mCH₄/g produced by white pomaces.

PALABRAS CLAVE

Fermentación *in vitro*.
Orujos de uva.
Producción de gas.
Producción de metano.

ADDITIONAL KEYWORDS

Gas production.
Grape pomaces.
In vitro fermentation.
Methane production.

INFORMATION

Cronología del artículo.

Recibido/Received: 16.04.2020

Aceptado/Accepted: 02.11.2020

OnLine: 15.01.2021

Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
carmen.barraso@juntaex.es.

INTRODUCCIÓN

La reducción de los gases de efecto invernadero (GEI) es un requisito internacional en la actualidad, debido a que han sido reconocidos como responsables significativos del calentamiento global del planeta (Ramanathan & Feng 2009). Dentro de este grupo de gases, encontramos el metano (CH₄), que presenta un potencial de calentamiento 25 veces mayor al dióxido de carbono (CO₂) (IPCC, 2007). Según informes de la

FAO (Steinfeld et al. 2006) los rumiantes, son responsables del 30% de las emisiones de CH₄ asociadas a la producción de alimento de origen animal. El CH₄ es un subproducto de la fermentación de la materia orgánica en el rumen y es responsable de la pérdida de entre 2-12% de la energía bruta proporcionada por la dieta (Hristov et al. 2015; Moumen et al. 2016). Este gas, es resultante de la fermentación anaerobia de un complejo sistema simbiótico entre bacterias, hongos y protozoos, capaces de digerir el material fibroso y convertirlo en

Efecto de la variedad de orujo de uva sobre la producción de gas y metano *in vitro*

Barraso C^{1,*}, López-Parra MM¹ y Rodríguez PL².

¹Departamento de Calidad de Carne, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de las Ciencias s/n, 10003, Cáceres, España.

*Autor para correspondencia: carmen.barraso@juntaex.es

Resumen: el metano es un gas de efecto invernadero que contribuye potencialmente al cambio climático. Los rumiantes, debido a las características de su sistema digestivo, son capaces de digerir la fibra mediante el proceso de fermentación ruminal, en el cual se generan gases como el metano. Los polifenoles presentan capacidad para inhibir la producción de dicho gas. Estos compuestos están presentes en distintas plantas y subproductos agroindustriales, como el orujo de uva, cuya inclusión en la dieta de corderos podría dar lugar a una disminución de las emisiones de metano entérico. Por tanto, el objetivo de este estudio ha sido evaluar la cinética de producción de gas, así como la producción de metano de 15 variedades de orujos de uva (blancos y tintos), con el fin de seleccionar aquellas variedades que sean menos metanogénicas y poder incorporarlas en el pienso de cebo de corderos. Para ello, se ha empleado la técnica de producción de gas *in vitro* en dos periodos de fermentación diferentes, 18 y 96 horas. Los resultados obtenidos para la producción de gas a 18 y 96 horas en los orujos tintos han sido: 59,77-104,28ml/g y para los blancos: 94,44-173,23ml/g respectivamente. En cuanto a la producción de metano en orujos tintos obtuvimos 3,72-6,79mlCH₄/g frente a 9,66-26,08mlCH₄/g producidos por los orujos blancos. Por tanto, se observa un mayor potencial inhibidor de la producción de gas y metano por parte del grupo de orujos tintos frente al de los orujos blancos.

Palabras claves: fermentación *in vitro*, orujos de uva, producción de gas, producción de metano.

Abstrac: methane is a greenhouse gas that potentially contributes to climate change. The characteristics of the digestive system of ruminants enable them to digest fibre by ruminal fermentation, generating gases such as methane. Polyphenols have the ability to inhibit the production of this gas. These compounds are available in different plants and agro-industrial by-products, such as grape pomaces, whose inclusion in diet of lambs could cause a decrease in enteric methane emissions. Therefore, the aim of this study was to evaluate the kinetics of gas production, as well as the production of methane from 15 varieties of grape pomace (white and red), in order to select those varieties with less methanogenic characteristics and include them in lamb feed. To this purpose, the *in vitro* gas production technique has been used in two different fermentation periods, 18 and 96 hours. The results obtained for gas production at 18 and 96 hours in red pomaces were 59,77-104,28ml/g and for white pomace 94,44-173,23ml/g respectively. In terms of methane production in red pomaces we obtained 3,72-6,79mlCH₄/g compared to 9,66-26,08mlCH₄/g produced by white pomaces.

Key Word: gas production, grape pomaces, *in vitro* fermentation, methane production.

1.-Introducción

La reducción de los gases de efecto invernadero (GEI) es un requisito internacional en la actualidad, debido a que han sido reconocidos como responsables significativos del calentamiento global del planeta (Ramanathan y Feng, 2009). Dentro de este grupo de gases, encontramos el metano (CH₄), que presenta un potencial de calentamiento 25 veces mayor al dióxido de carbono (CO₂) (IPCC, 2007). Según informes de la FAO (Steinfeld *et al.*, 2006) los rumiantes, son responsables del 30% de las emisiones de CH₄ asociadas a la producción de alimento de origen animal. El CH₄ es un subproducto de la fermentación de la materia orgánica en el rumen y es responsable de la pérdida de entre 2-12% de la energía bruta proporcionada por la dieta (Hristov *et al.*, 2015; Moumen *et al.*, 2016). Este gas, es resultante de la fermentación anaerobia de un complejo sistema simbiótico entre bacterias, hongos y protozoos, capaces de digerir el material fibroso y convertirlo en ácidos grasos volátiles (AGV), gases de fermentación y calor (Alejos *et al.*, 2018). El exceso de H₂ generado en la conversión de glucosa a AGV y el CO₂ producido por la descarboxilación de metabolitos durante la fermentación, son

utilizados como sustratos por las arqueas y protozoos, para transformarlos en CH₄ (Hook *et al.*, 2010; Alayon *et al.*, 2018). Existen distintas estrategias para la mitigación de la producción de CH₄ ruminal, entre ellas, la incorporación de aditivos químicos en la alimentación del ganado, sin embargo, esta medida se ve limitada por la posible aparición de residuos en productos de origen animal para consumo humano, lo cual, lleva a ciertas restricciones legales como la retirada del uso de antibióticos (entre ellos la monensina) en la Unión Europea desde enero de 2006 (EC, 2003). Por ello, existe una continua búsqueda de compuestos bioactivos naturales, como alternativa al uso de químicos. Estos compuestos están presentes en plantas y subproductos agroindustriales, como es el caso de los taninos, pertenecientes al grupo de los polifenoles. Estos, presentan capacidad inhibitoria sobre la producción del CH₄ a nivel ruminal, debido a sus propiedades antimicrobianas (Patra y Saxena, 2010; Broucek, 2018), ya que actúan sobre la pared celular y los enzimas extracelulares, inhibiendo el transporte de nutrientes y dificultando el crecimiento microbiano (McSweeney *et al.*, 2001). Dentro del grupo de subproductos agroindustriales destaca el orujo de uva, resultante del proceso de elaboración de diferentes vinos y caracterizado por presentar un alto contenido en polifenoles (Peixoto *et al.*, 2018). Su inclusión en la dieta de corderos supondría un sistema sinérgico entre agricultura y ganadería, disminuyendo, por una parte, el exceso de biomasa generado por la industria vitivinícola y, por otra parte, reduciendo la emisión de GEI procedente de los rumiantes, en concreto de CH₄ ruminal, dando lugar a una producción de corderos más sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar 15 variedades de orujo de uva (blancos y tintos), de las cuales, se realizó un estudio de la producción de CH₄ y gas total tras 18 horas de fermentación, así como, un estudio de la cinética de producción de gas y la producción de CH₄ tras 96 horas de fermentación *in vitro* en un sistema de jeringas, con la finalidad de determinar la influencia varietal (blanca y tinta) sobre estos parámetros y detectar variedades con mayor potencial antimetanogénico. El objetivo último es incorporar estas variedades en el concentrado de cebo de corderos para tratar de disminuir la producción de CH₄ durante su crecimiento.

2.-Material y métodos

Se han utilizado 15 variedades distintas de orujo de uva procedentes de la comarca de Almendralejo (Badajoz, Suroeste de España), 8 tintas y 7 blancas, obtenidas en la campaña 2018. Tras su recepción en el laboratorio, las muestras fueron desecadas en estufa para determinar su contenido en humedad y facilitar su molienda en molino ciclónico con tamiz de 1mm (Rescht ZM200). Los análisis se han realizado siguiendo el Reglamento CE 152/2009 (EC, 2009), para cenizas, materia orgánica (M.O), grasa bruta (G.B), proteína bruta (P.B), fibra bruta (F.B), fibra neutro detergente (F.N.D) y fibra ácido detergente (F.A.D).

El proceso de fermentación *in vitro* ha seguido básicamente la técnica propuesta por Menke *et al.* (1979) utilizando jeringas de vidrio de 120ml de capacidad con punta tipo Luer y midiendo el desplazamiento del émbolo producido por el gas de fermentación. La punta Luer se cierra con una válvula de tres vías que garantiza un cierre hermético y permite acoplar distintos dispositivos de medida.

Como fuente de inóculo para la fermentación, se utilizaron heces recogidas directamente del recto de ovejas (El Shaer *et al.*, 1987) pertenecientes a la granja de la Facultad de Veterinaria de Cáceres y Finca la Orden-Valdesequera, inmediatamente antes del inicio del proceso. El procedimiento consta de los siguientes pasos:

Fabricación de saliva artificial a partir de cuatro soluciones (Aghajanzadeh *et al.*, 2015): solución macromineral, solución tampón, solución reductora y solución micromineral.

Para iniciar el proceso de fermentación depositamos 0,2g de orujo de estudio junto con 30ml de líquido fecal (mezcla homogénea de heces y saliva artificial) en una jeringuilla y posteriormente se incubaron en una estufa a una temperatura de 39°C.

En cada ensayo se emplearon dos juegos de 12 jeringas, de las cuales, dos actúan de blanco (30ml de líquido fecal), otras dos actúan de testigo (0,2g de cebada como sustrato fermentador de referencia), las ocho restantes contienen como sustrato fermentador los orujos de estudio (8/variedad). El proceso de fermentación se desarrolló en dos condiciones temporales diferentes, por una parte, se midió la producción potencial de gas y CH₄ tras 18 horas de incubación ya que se considera suficiente para determinar el potencial de degradación de un concentrado (Damiran y Yu, 2010) y por otra parte, las

mismas muestras se sometieron a un proceso de incubación de 96 horas, anotando el avance del émbolo a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 horas siguiendo el protocolo ordinario (El Meadaway *et al.*, 1998; Rasoul y Amiri, 2016), con el fin de estudiar la cinética de producción de gases y la formación de CH₄ tras 96 horas de fermentación.

Las curvas de producción de gas se modelizaron siguiendo los modelos propuestos por Orskov y McDonald (1979) $p = a + b (1 - e^{-ct})$ y McDonald (1981) $p = a + b (1 - e^{-c(t-t_l)})$.

La medida de la producción de CH₄ se realizó al terminar la prueba de fermentación a las 18 y 96 horas, mediante un detector de gases GMI PS211. Este detector determina el porcentaje de CH₄ en el gas producido, utilizando un sistema de circuito cerrado de gases conducidos a un bote Duran de 250-500ml para las jeringas incubadas a 18 y 96 horas respectivamente, expresándose la concentración final como ml de CH₄/g de material fermentado.

El posible efecto de la variedad de orujo de uva (tinto/blanco) sobre la producción de gas total y CH₄ se estudió mediante un análisis prueba de Kruskal-Wallis para establecer las posibles diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para ello se utilizó el programa SPSS (V22). La modelización de la cinética de producción de gas, se ajustó mediante programación Solver, en Excel, minimizando la diferencia de cuadrados entre los datos reales y ajustados al variar las constantes de la ecuación (a, b, c, t_l).

3.-Resultados y discusión

En la **Tabla I. 1** se recogen los datos referentes a la composición química de los orujos de estudio. Podemos observar que no existen diferencias significativas en ninguno de los componentes analizados para las variedades tintas y blancas. Podríamos definir nutritivamente este subproducto como fibroso, con un contenido moderado en proteínas y ligeramente alto en grasas.

Los valores obtenidos para la composición química de los orujos se encuentran en el rango de variabilidad descrito por diferentes autores (Baumgärtel *et al.*, 2007; Abarghuei *et al.*, 2010; Moate *et al.*, 2014; Foiklang *et al.*, 2016). Esta variabilidad, puede ser debida a que los componentes que lo forman (hollejo, granilla y pulpa) no siempre se

encuentran en la misma proporción, debido tanto al procesado de la uva como a la variedad vegetal utilizada (Deng *et al.*, 2011). La G.B es aportada principalmente por la granilla (Marginet, 2004). La escasa diferencia entre F.N.D y F.A.D y el elevado valor de esta última, presupone una baja fermentabilidad de la fracción fibrosa (McDonald *et al.*, 2010; Van Soest, 1967).

Tabla I. 1.- Composición química de los orujos de estudio, expresado en g/kg de materia seca.

VARIEDAD	Est	M.O	G.B	P.B	F.B	F.N.D	F.A.D
OR.B	<i>Med</i>	926,7	66,6	112,4	266	541,7	468,2
	<i>d.t</i>	6,9	17,4	4,9	32,9	56	42
	<i>c.v</i>	0,75	26,15	4,40	12,35	10,35	8,97
	<i>Max</i>	935,6	91,2	118,4	309,9	610,3	508,5
	<i>Min</i>	916,4	48,2	105,3	205,1	462,6	404,6
OR.T	<i>Med</i>	928,6	54,6	105,7	236,5	498,7	444,7
	<i>d.t</i>	5,2	14,4	17,0	17,7	73,8	67,4
	<i>c.v</i>	0,005	0,26	0,16	0,07	0,14	0,15
	<i>Max</i>	936,0	75,0	132,5	259	654,1	587,2
	<i>Min</i>	922,5	32	81,7	203,8	440,9	381,4
	<i>p</i>	0,560	0,173	0,307	0,055	0,222	0,424
TODOS	<i>Med</i>	927,6	61	109,3	252,2	521,6	457,3
	<i>d.t</i>	6,1	16,7	12,2	30,1	66,3	54,5
	<i>c.v</i>	0,006	0,27	0,11	0,11	0,12	0,11
	<i>Max</i>	936	91,2	132,5	309,9	654,1	587,2
	<i>Min</i>	916,4	32,0	81,7	203,8	440,9	381,4

Est, estadísticos; M.O, materia orgánica; G.B, grasa bruta; P.B, proteína bruta; F.B, fibra bruta; F.N.D, fibra neutro detergente; F.A.D, fibra ácido detergente; OR.B, orujos variedad blanca; OR.T, orujos variedad tinta; *p*, *p* valor; *Med*, media; *d.t*, desviación típica; *c.v*, coeficiente de variación; *Max*, máximo; *Min*, mínimo.

En la **Figura I. 1** y **Tabla I. 3** se encuentran representados los valores de producción de gas tras 96 horas de fermentación. Gráficamente se puede observar que los orujos blancos empiezan a fermentar con mayor potencia que los tintos y con una producción mayor de gas desde el inicio hasta el final del proceso de fermentación. El mismo comportamiento vemos en fermentaciones a 18 horas (**Tabla I. 2**). Son los orujos blancos los que mayor cantidad de gas producen frente a los tintos. Esta diferencia de producción de gas entre orujos blancos y tintos puede ser debido a una mayor presencia de carbohidratos fácilmente fermentables en los orujos blancos, ya que, en la elaboración de vinos blancos, no se lleva a cabo el proceso de maceración, por tanto, el orujo es retirado tras el prensado o estrujado, conservando un mayor nivel de fructosa (Deng *et al.*, 2011).

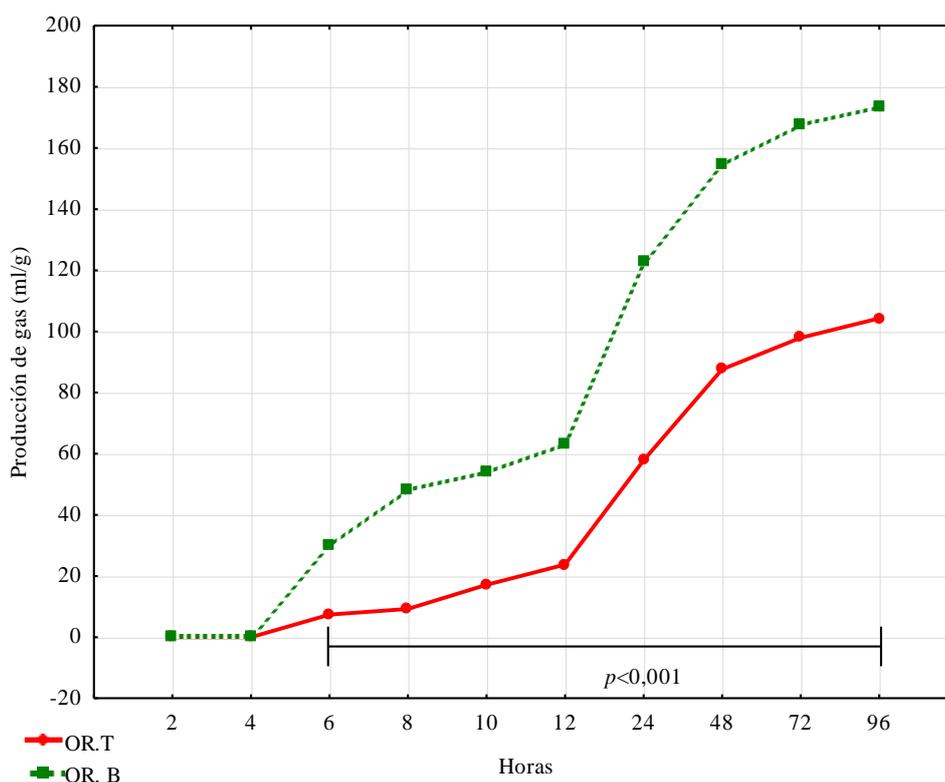


Figura I. 1.-Producción de gas (ml/g) tras 96h de fermentación.

Tabla I. 2.- Producción de gas (ml/g) y CH₄ (mlCH₄/g) tras 18h de fermentación.

	OR.B		OR.T		<i>p</i>
	<i>Med</i>	<i>d.t</i>	<i>Med</i>	<i>d.t</i>	
P.G-18h	94,44	17,12	59,77	25,01	0,0001
CH₄-18h	9,66	2,87	3,72	1,47	0,0001

OR.B, orujos variedad blanca; OR.T, orujos variedad tinta; Med, media; d.t, desviación típica; *p*, p-valor; P.G, producción de gas.

Tabla I. 3.- Producción de gas (ml/g) y CH₄ (mlCH₄/g) tras 96h de fermentación.

	OR.B		OR.T		<i>p</i>
	<i>Med</i>	<i>d.t</i>	<i>Med</i>	<i>d.t</i>	
P.G 2h	0	0	0	0	<i>n.s</i>
P.G 4h	0	0	0	0	<i>n.s</i>
P.G 6h	29,80	22,37	7,35	11,18	0,0001
P.G 8h	48,07	31,20	9,24	12,37	0,0001
P.G 10h	54,33	29,12	17,10	12,55	0,0001
P.G 12h	63,18	26,44	23,73	11,02	0,0001
P.G 24h	122,53	36,34	57,84	12,08	0,0001
P.G 48h	154,65	33,67	87,63	16,87	0,0001
P.G 72h	167,64	32,70	97,94	14,90	0,0001
P.G 96h	173,23	32,69	104,28	12,70	0,0001
CH₄-96h	26,08	8,35	6,79	1,77	0,0001

OR.B, orujos variedad blanca; OR.T, orujos variedad tinta; Med, media; D.T, desviación típica; *p*, p-valor; *n.s*, no significativo; P.G, producción de gas.

De acuerdo con Salado *et al.* (2018) en un proceso fermentativo, primero se fermentan los azúcares solubles, seguidos por polisacáridos de pared celular y, en último lugar, polisacáridos de pared lignificados. Esta hipótesis puede ser avalada por los resultados obtenidos para el parámetro “*tl*” de la ecuación de McDonald (1981) (**Tabla I. 4**), el cual, hace referencia al tiempo de retraso del inicio de la fermentación, que a su vez varía en función del sustrato degradado y la presencia de carbohidratos solubles, (Coblentz *et al.*, 2013). Teniendo esto en cuenta y viendo los resultados de nuestro estudio, observamos que los orujos blancos presentan un valor de “*tl*” significativamente más bajo que los orujos tintos. Russo *et al.* (2017), estudiaron la producción de gas de diferentes variedades de orujos de uva (tintos y blancos), obtuvieron resultados acordes con los nuestros, siendo los orujos tintos los que menor cantidad de gas producían frente a los blancos.

Tabla I. 4.- Modelización de la producción de gas, parámetros de la ecuación de Orskov y McDonald (1979) y McDonald (1981).

	Orskov y McDonald (1979)			McDonald (1981)			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>tl</i>
<i>p</i>	0,0001	0,0001	0,0001	0,178	0,0001	0,0001	0,0001
OR.B <i>Med</i>	-6,45	43,22	0,06	-0,85	37,62	0,06	2,54
<i>d.t</i>	2,09	6,12	0,02	2,63	5,88	0,02	1,20
OR.T <i>Med</i>	-3,27	26,96	0,03	-0,13	23,82	0,03	4,03
<i>d.t</i>	0,77	2,68	0,01	0,79	2,34	0,01	1,57

a, fracción soluble o degradable a tiempo 0; b, fracción insoluble pero potencialmente degradable; c, velocidad o tasa de degradación; *tl*, tiempo de retraso en el inicio de la fermentación; *p*, p-valor; *Med*, media; *d.t*, desviación típica; OR.B, orujos variedad blanca; OR.T, orujos variedad tinta.

Las diferencias en cuanto a la producción de gas encontradas por los diferentes autores para el orujo de uva, pueden ser debidas a que los componentes que lo conforman no siempre se encuentran en la misma proporción. Cada uno de ellos presenta diferencias en cuanto al contenido en fibra y perfil lipídico, influyendo directamente sobre las propiedades fermentativas, y, por tanto, alterando de un modo u otro la producción de gas y CH₄ en función de la cantidad presente de cada componente (Russo *et al.*, 2017). Además de la diferente composición química del orujo, otra causa puede asociarse a la presencia de taninos que inhiben la fermentación. Los orujos blancos no tienen transferencia de taninos al mosto por falta de fermentación conjunta con los hollejos (Gómez *et al.*, 2007) lo que haría pensar en una mayor repercusión sobre la fermentación. A pesar de ello, los mayores niveles de polifenoles totales de las variedades tintas, tanto en uvas (Gougoulías *et al.*, 2018) como en orujo (Sagdic *et al.*, 2011) hacen que tengan una mayor actividad antimicrobiana (Kiralý *et al.*, 2009).

En cuanto a los valores de producción de CH₄ medidos a 18 y 96 horas quedan recogidos en la **Tabla I. 2** y **Tabla I. 3** respectivamente. Podemos observar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$), siendo los orujos tintos los que menor cantidad de CH₄ producen en ambos casos.

Nuestros resultados difieren de los encontrados por Russo *et al.* (2017) quienes no encontraron diferencias en la producción de CH₄ en función del tipo de orujo utilizado. Sin embargo, están en línea con los descritos por Jayanegara *et al.* (2012) quienes en un meta-analysis de los resultados publicados sobre rumiantes, observan un claro efecto antimetanogénico en función del nivel de taninos del alimento.

Dicho efecto puede ser debido bien a la concentración de polifenoles presentes en el mismo, o bien a la naturaleza de estos (Patra *et al.*, 2017). A ello hay que añadir el efecto maceración, en el caso de las uvas tintas, con transferencia de polifenoles al vino (Lingua *et al.*, 2016), por lo que se evidencia un efecto cualitativo intrínseco, vinculado a las uvas tintas.

La modelización de la producción de gas se realizó siguiendo los modelos propuestos por Orskov y McDonald (1979) y McDonald (1981). Los resultados encontrados para los parámetros de ambas ecuaciones se recogen en la **Tabla I. 4**.

El valor de “ a ” se encuentra vinculado a la fracción inmediatamente degradable del alimento (Orskov y McDonald, 1970) y presenta un valor negativo en ambas ecuaciones y para ambos orujos, al faltar la restricción de no negatividad en la resolución del problema. Un comportamiento similar en el ajuste de las ecuaciones ha sido indicado por otros autores que trabajan con pastos de baja calidad y ricos en polifenoles (Khazaal *et al.*, 1994) y sería indicativo de una dificultad en el inicio del proceso fermentativo, estos resultados están acordes con la dinámica real observada, puesto que hasta las 6 horas no se observa producción de gas (**Figuras I. 2 y I. 3, Tabla I. 2**). El parámetro “ c ”, es un coeficiente de degradabilidad intrínseco o característico de cada material. En nuestro caso, encontramos el mismo valor del parámetro para ambas ecuaciones. Siendo superior en el caso del orujo blanco, probablemente debido a la presencia de un mayor nivel de carbohidratos no fibrosos y más fermentables (Basalan *et al.*, 2011). Estos valores se aproximan a lo publicado por Alipour y Rouzbehan (2007) para subproducto de uvas, y está en consonancia con el resultado real, al ser el orujo blanco más activo en la producción de gas.

Las **Figuras I. 2 y I. 3** muestran los valores de cinética de producción de gas a partir de las ecuaciones propuestas, para orujos blancos y tintos respectivamente. En general, el modelo presenta una tendencia creciente hasta las 48 horas de fermentación, a partir de la cual, presenta un comportamiento asintótico. Ambos modelos presentan un ajuste similar siendo en el caso de los orujos tintos el modelo de McDonald el que mejor se ajusta. El valor final de gas acumulado se asemeja al valor determinado de manera experimental, siendo prácticamente igual en el caso de los orujos tintos.

En relación al valor nutritivo, Tobias *et al.* (2010) realizaron un análisis de distintos vegetales, obteniendo valores de producción de gas para el tomate, jengibre y espinaca similares a los obtenidos para los orujos de estudio (**Figura I. 2 y Figura I. 3**), lo cual, es indicativo de un potencial nutritivo similar para estos productos.

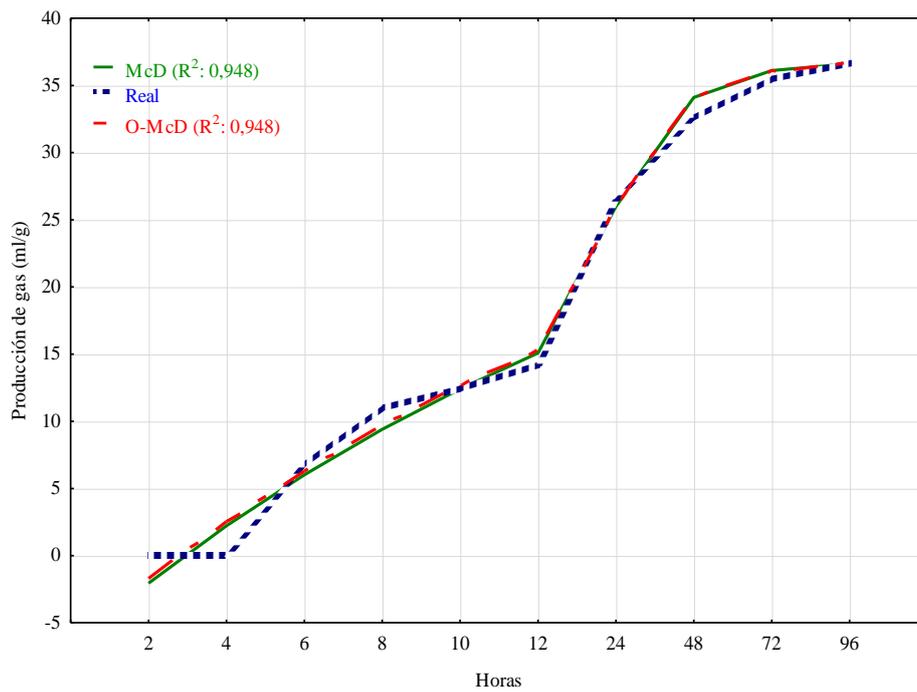


Figura I. 2.- Modelización de la producción de gas Orskov y McDonald (1979) (O-McD) y McDonald (1981) (McD) para orujos blancos.

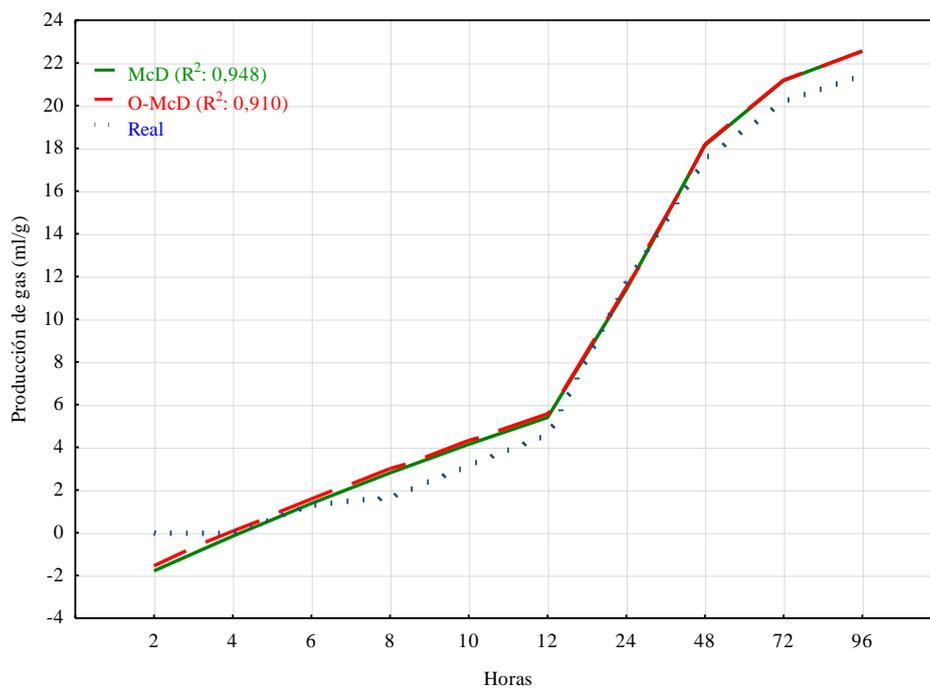


Figura I. 3.- Modelización de la producción de gas Orskov y McDonald (1979) (O-McD) y McDonald (1981) (McD) para orujos tintos.

4.-Conclusión

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que los orujos tintos presentan un potencial de inhibición de producción de gas y CH₄, *in vitro*, superior a la de los orujos blancos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado a través de la beca INIA CPD2016-0037. Agradecemos a M^a Jesús Guerrero, Yolanda Jiménez, J. Antonio Megías su inestimable colaboración en la realización de este trabajo, con su actividad en el laboratorio y en el manejo del ganado.

Referencias bibliográficas

- Abarghuei MJ, Rouzbehan Y, Alipour, D (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132(1-3), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.002>
- Aghajanzadeh A, Maheri N, Salmat R, Ebrahimnezhad Y, Ghorbani A (2015). Developing a modified *in vitro* gas production technique to replace nylon bag method of evaluating protein degradation of alfalfa hay in ruminants. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(2), 339-345.
- Alayón JA, Jiménez G, Piñeiro AT, Canul J, Albores S, Villanueva G, Nahed J, Ku JC (2018). Estrategias de mitigación de gases de efecto invernadero en la ganadería. *Agroproductividad*, 11(2), 9-15.
- Alejos JI, Almaraz I, Peralta JJG, Sánchez P, Soriano R, Torres MG (2018). Consideraciones de bienestar animal en las estrategias para la disminución de la producción de metano entérico por rumiantes. *Agroproductividad*, 11(2), 57-63.
- Alipour D, Rouzbehan Y (2007). Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1-2), 138-149.

- Basalan M, Gungor T, Owens FN, Yacinkaya I (2011). Nutrient content and *in vitro* digestibility of Turkish grape pomaces. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4), 194-198. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.005>
- Baumgärtel T, Kluth H, Epperlein K, Rodehutsord M (2007). A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research*, 67(2-3), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.11.002>
- Broucek J (2018). Methane abatement strategies based on genetics and dietary manipulation of ruminants: a review. *Archivos de Zootecnia*, 67(259), 448-458. <https://doi.org/10.21071/az.v67i259.3804>
- Coblentz WK, Nellis SE, Hoffman PC, Hall MB, Weimer PJ, Esser NM, Bertram MG (2013). Unique interrelationships between fiber composition, water-soluble carbohydrates, and *in vitro* gas production for allgrown oat forages. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 7195-7209. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6889>
- Damiran D, Yu P (2010). Chemical profile, rumen degradation kinetics, and energy value of four hullless barley cultivars: comparison of the zeroamylose waxy, waxy, highamylose, and normal starch cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10553–10559. <https://doi.org/10.1021/jf101624a>
- Deng Q, Penner MH, Zhao Y (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712–2720. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.026>
- EC (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union*, 18102003.
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*, 26022009.
- El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ (1998). Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining *in vitro* digestibility and gas production. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 673-679. <https://doi.org/10.4141/A97-109>

- El Shaer HM, Omed HM, Chamberlain AG (1987). Use of faecal organisms from sheep for the in vitro determination of digestibility. *Journal of Agricultural Science Cabrigde*, 109(2), 257-259. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080667>
- Foiklang S, Wanapat M, Norrapoke, T (2016). In vitro rumen fermentation and digestibility of buffaloes as influenced by grape pomace powder and urea treated rice straw supplementation. *Animal Science Journal*, 87(3), 370–377. <https://doi.org/10.1111/asj.12428>
- Gómez MJ, González ML, Hernanz D, Fernández MA, Vicario IM, Heredia FJ (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.021>
- Gougoulis N, Vagelas I, Giurgiulescu L, Ntalla MN, Nterkou P, Salonikioti A, Efthimionu S, Sugar IR (2018). Comparative study on polyphenols content and antioxidant effect of some grape varieties grown in central Greece. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 10(1), 141-149.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, Branco AF, Moate PJ, Deighton MH, Williams SRO, Kindermann M, Duval S (2015). An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10663–10668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504124112>
- Hook SE, Wright ADG, McBride BW (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010, 111. <https://doi.org/10.1155/2010/945785>
- IPCC (2007). Cambio climático 2007. Base de Ciencia Física. Grupo de Trabajo I. Cuarto Informe de Evaluación del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático. Resumen. Disponible en: <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2020/02/ar4wg1sumvolsp.pdf>

- Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M (2012). Metaanalysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3), 365-375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x>
- Khazaal K, Boza J, Ørskov ER (1994). Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without insoluble polyvinylpolypyrrolidone or nylon bag. *Animal Feed Science and Technology*, 49(1-2), 133-149. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90087-6)
- Kiraly Z, Moricz AM, Ott PG, Katay G, Belai I, Tyihak E (2009). Comparison of components from red and white wines for antimicrobial activity by biodetection after OPLC separation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32(9), 1259-1272. <https://doi.org/10.1080/10826070902854417>
- Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Varoni MV (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208(), 228-238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.009>
- Marginet X (2004). Project Life 04 ENV/ES/000237, Grape Tannins Saving of forest exploitation for obtaining of tanning extracts through valorisation of wine waste. Disponible en: https://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n_proj_id=2687&docType=pdf. (Consultado: febrero 2020).
- McDonald I (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, 96(1), 251-252.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2010). *Animal nutrition*, 7th edition (Chp. 8), Pearson, Harlow, England, U.K.
- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 83-93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00232-2)
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979). The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminants

- feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 93(1), 217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>
- Moate PJ, Williams SRO, Torok VA, Hannah MC, Ribaux BE, Tavendale MH, Eckard RJ, Jacobs JL, Auldish MJ, Wales WJ (2014). Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. *Journal Dairy Science*, 97(8), 5073-5087. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7588>
- Moumen A, Azizi G, Chekroun K, Ben, Baghour, M (2016). The effects of livestock methane emission on the global warming: A review. *International Journal of Global Warming*, 9(2), 229–253.
- Ørskov ER, McDonald IM (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 92(2), 499-503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Patra AK, Saxena J (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(1112), pp. 1198-1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>
- Patra A, Park T, Kim M, Zhongtang Y (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by antimethanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 13-31.
- Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhelha RC, Barros L, Pinho SP, Ferreira I (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Ramanathan V, Feng Y (2009). Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmospheric Environment*, 43(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.063>
- Rasoul B, Amiri B (2016). Nutritive Value Assessment of Three Rangeland Species Using Sheep Rumen and Feces Fluid. *Environmental Resources Research*, 4(2), 141-152.

- Russo VM, Jacobs JL, Hannah MC, Moate PJ, Dunshea FT, Leury BJ (2017). In vitro evaluation of the methane mitigation potential of a range of grape marc products. *Animal Production Science*, 57(7), 1437-1444. <https://doi.org/10.1071/AN16495>
- Sagdic O, Ozturk I, Ozkan G, Yetim H, Ekici L, Yilmaz MT (2011). RPHPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their Antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry*, 126(4), 1749-1758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.075>
- Salado N, Santillán P, García AR, Pérez J, Morales J (2018). Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 67(257), 55-59.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, De Haan, C (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*, FAO, Rome, Italy.
- Tobias C, Hector B, Mazza PH, Oliveira LM, Marques P, Alves EJ, Ørskov ER (2010). Characterization of vegetables and fruits potential as ruminant feed by *in vitro* gas production technique. *Livestock Research for Rural Development*, 22(9), 168.
- Van Soest, PJ (1967). Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of Animal Science*, 26(1), 119-128.

Capítulo II

*Effect of grape pomace incorporation on
fermentative characteristics of a
concentrate*

Journal of Agriculture and Environmental Science

10 (1): 69-79. 2021

DOI: 10.15640/jaes.v10n1a8

Effect of Grape Pomace Incorporation on Fermentative Characteristics of a Concentrate

Barraso Carmen¹, López-Parra M.Montaña¹ & Rodríguez Pedro Luis²

Abstract

Agricultural activity contributes actively to global warming by emitting greenhouse gases (GHGs) such as methane (CH₄), being ruminants one of the main producers of this gas. On the other hand, there is excess of agro-industrial by-products such as grape pomace with a high polyphenolic concentration. Therefore, it is necessary to develop strategies to reduce both GHGs and agro-industrial residues. In this work, the use of the by-product grape pomace, rich in tannins, is proposed as a nutritional strategy to be incorporated in ruminant feed concentrates to reduce the production of ruminal CH₄. For this, four grape pomaces *Tempranillo* variety (P1, P2, P3, P4) from different wineries, were added to a base concentrate such as barley at four levels (1.25%, 2.5%, 5% and 7.5%). These samples were fermented *in vitro* in two different periods of time (18 and 96 h). The kinetics of total gas and CH₄ production were studied. A quantitative inhibitory effect was observed for both parameters when incorporating 7.5% grape pomace, as well as a variable qualitative effect depending on the fermentation time, being P3 the most effective pomace after 18 h and P2 after 96 h. Therefore, the incorporation of grape pomace in ruminant fattening feed could represent an alternative to the environmental problems of the agricultural sector within a green and circular economy model.

Keywords: grape pomace; methane production; gas production; *in vitro* fermentation.

1. Introduction

The Spanish agricultural sector represents an important socioeconomic and environmental activity, with half of the country's surface dedicated to agriculture and livestock farming. Regarding the livestock sector, Spain is the second country in the European Union with the largest number of sheep, with most of the livestock concentrated in the Extremadura region (MAPA, 2020). Ruminants are characterized by a digestive system capable of digesting fibrous material into volatile fatty acids, fermentation gases and heat (Owens and Basalan, 2016). Fermentation gases include CH₄, a potent greenhouse gas, which accounts for about a quarter of the anthropogenic CH₄ generated (Lassey, 2008). In terms of agricultural activity, Spain is the country with the largest area of vineyard cultivation in the world, ranking third after France and Italy in wine production (OIV, 2019). The wine industry generates seasonally a high volume of by-products with high organic content. Among these by-products, grape pomace represents between 20-25% of the weight of fresh grapes, characterized by its polyphenolic properties (Yu and Ahmedna, 2013). Considering both premises, this study arises because it is essential to propose strategies that allow an environmentally sustainable management.

In this work, an *in vitro* analysis has been carried out on the fermentative and methanogenic profile of a concentrate incorporating dried grape pomace in different proportions due to its concentration of tannins and ruminal antimethanogenic properties (Bhatta *et al.*, 2013). The use of these by-products by incorporating them into the ruminant diet would reduce the costs of the ration, as well as the possibility of obtaining a healthy and higher quality final product for the consumer.

2. Material and Methods

2.1. Mixing system

After a previous analysis of *in vitro* fermentation of 15 grape pomace varieties (Barraso *et al.*, 2021), four pomaces were selected (P1, P2, P3, P4) whose gas and CH₄ production was lower. The selected pomaces belonged to the *Tempranillo* variety.

¹ Meat quality Department, Centre of Scientific and Technological Research of Extremadura (CICYTEX) 06187 Badajoz, Spain carmen.barraso@iunataex.es; Tlf. 924014095

² Department of Animal Production and Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Av. de las Ciencias s/n, 10003, Cáceres, Spain.

Effect of Grape Pomace Incorporation on Fermentative characteristics of a Concentrate

Barraso C^{1,*}, López-Parra MM¹ y Rodríguez PL².

¹Departamento de Calidad de Carne, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de las Ciencias s/n, 10003, Cáceres, España.

*Autor para correspondencia: carmen.barraso@juntaex.es

Abstrac: Agricultural activity contributes actively to global warming by emitting greenhouse gases such as methane, being ruminants one of the main producers of this gas. On the other hand, there is excess of agro-industrial by-products such as grape pomace with a high polyphenolic concentration. Therefore, it is necessary to develop strategies to reduce both greenhouse gases and agro-industrial residues. In this work, the use of the by-product grape pomace, rich in tannins, is proposed as a nutritional strategy to be incorporated in ruminant feed concentrates to reduce the production of ruminal methane. For this, four grape pomaces *Tempranillo* variety (P1, P2, P3, P4) from different wineries, were added to a base concentrate such as barley at four levels (1,25%, 2,5%, 5% and 7,5%). These samples were fermented *in vitro* in two different periods of time (18 and 96h). The kinetics of total gas and methane production were studied. A quantitative inhibitory effect was observed for both parameters when incorporating 7,5% grape pomace, as well as a variable qualitative effect depending on the fermentation time, being P3 the most effective pomace after 18h and P2 after 96h. Therefore, the incorporation of grape pomace in ruminant fattening feed could represent an alternative to the environmental problems of the agricultural sector within a green and circular economy model.

Key words: grape pomace; methane production; gas production; *in vitro* fermentation.

1.-Introduction

The Spanish agricultural sector represents an important socioeconomic and environmental activity, with half of the country's surface dedicated to agriculture and livestock farming. Regarding the livestock sector, Spain is the second country in the European Union with the largest number of sheep, with most of the livestock concentrated in the Extremadura region (MAPA, 2020). Ruminants are characterized by a digestive system capable of digesting fibrous material into volatile fatty acids, fermentation gases and heat (Owens y Basalan, 2016). Fermentation gases include methane (CH₄), a potent greenhouse gas, which accounts for about a quarter of the anthropogenic CH₄ generated (Lassey, 2008). In terms of agricultural activity, Spain is the country with the largest area of vineyard cultivation in the world, ranking third after France and Italy in wine production (OIV, 2019). The wine industry generates seasonally a high volume of by-products with high organic content. Among these by-products, grape pomace represents between 20-25% of the weight of fresh grapes, characterized by its polyphenolic properties (Yu y Ahmedna, 2013). Considering both premises, this study arises because it is essential to propose strategies that allow an environmentally sustainable management.

In this work, an *in vitro* analysis has been carried out on the fermentative and methanogenic profile of a concentrate incorporating dried grape pomace in different proportions due to its concentration of tannins and ruminal antimethanogenic properties (Bhatta *et al.*, 2013). The use of these by-products by incorporating them into the ruminant diet would reduce the costs of the ration, as well as the possibility of obtaining a healthy and higher quality final product for the consumer.

2.-Material and methods.

Mixing system

After a previous analysis of *in vitro* fermentation of 15 grape pomace varieties (Barraso *et al.*, 2021), four pomaces were selected (P1, P2, P3, P4) whose gas and CH₄ production was lower. The selected pomaces belonged to the *Tempranillo* variety.

The pomaces, previously dried and grounded, were mixed in different proportions with a base concentrate (barley). The mixing process was carried out with a mixer, after having carried out previous tests to determine the optimum mixing time. The percentage of pomace incorporated into the concentrate was: 1,25%, 2,5%, 5% and 7,5% so that we have four mixtures of each selected pomace plus the barley.

Chemical analysis

The mixtures were analyzed according to EC Regulation 152/2009 (EC, 2009), for ash/organic matter, crude fat, crude protein, crude fibre, neutral detergent fibre, and acid detergent fibre.

Gas production Kinetics and modelling

The *in vitro* fermentation process was carried out according to the technique proposed by Menke *et al.* (1979) using 120 ml glass syringes with Luer-type tips and measuring the displacement of the plunger produced by the fermentation gas. The Luer tip is closed with a three-way valve that ensures a hermetic seal and allows the attachment of multiple measuring devices.

Faeces are used as a source of inoculum for fermentation, collected immediately before the beginning of the study and directly of the rectum of the sheep (Axford y Chamberlain, 1987). The animals belonged to the farm of the Veterinary Faculty of Cáceres and the flock of the research farm “La Orden-Valdesequera”. This procedure consists of the following stages:

Preparation of artificial saliva from four solutions (Aghajanzadeh-Golshani *et al.*, 2015): macromineral solution, buffer solution, reducing solution and micromineral solution.

In order to initiate the fermentation process, 0,2g of the study mixture together with 30ml of faecal liquid (homogeneous mixture of faeces and artificial saliva) were collected in a syringe and then incubated in a 39°C oven.

Two sets of 12 syringes were used in each trial. Two of them act as blank (30ml faecal fluid), two others act as control (0,2g barley as reference fermenting substrate), and the remaining eight syringes contain the pomace mixtures (4/mix).

In order to the fermentation process was carried out under two different conditions. On the one hand, the potential production of gas and CH₄ were measured after 18h of incubation, time enough to determine the potential degradation of a concentrate (Damiran y Yu, 2010), and on the other hand, the same samples were incubated for 96h, recording the progress of the plunger at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 and 96 hours of incubation according to the described procedure (El-Meadaway *et al.*, 1998; Rasouli and Amiri, 2016). The gas production curves were analysed according to McDonald (McDonald, 1981) $p = a + b (1 - e^{-c(t-t_0)})$.

Measurement of CH₄ final production

The CH₄ production was measured at the end of the fermentation test at 18 and 96 hours, using a GMI PS211 gas detector. This detector determines the percentage of CH₄ in the gas produced using a closed gas circuit system connected to a 250ml (18h)-500ml (96h) Duran canister from syringe. A three-way tips system allowed the process to remain hermetic and to direct the gases in the right direction. The final concentrate was expressed as ml of CH₄/g of fermented material.

Statistical analysis

The possible effect of the grape and percentage on the total gas and CH₄ production were studied by a non-parametric Kruskal-Wallis test. When differences were statistically significant ($p < 0,05$), differences between means were established by Dunn's test using SPSS program (V22). The modelization of the gas production kinetics was adjusted by Solver Lineal Programming in Excel, minimizing the difference of squares between the real and adjusted data as the constants of the equation (a, b, c, t_0) vary.

3.- Results

Chemical analysis (**Table II. 1**) indicate that the barley values are within the range of variability described for this cereal. As for the pomaces, it could be considered as fibrous by-products, with a moderate protein content and slightly high in fat. The mixtures indicate the corresponding composition according to the percentage and type of pomace incorporated.

Table II. 1.- Chemical composition of barley, pomaces and pomace-barley mixtures expressed in g/kg dry matter (mean \pm standard deviation).

	M.O	C.Fat	C.P	C.F	N.F.D	A.F.D
Barley	97,38 \pm 8,56	2,17 \pm 0,03	9,41 \pm 0,36	3,54 \pm 0,19	20,85 \pm 0,19	5,87 \pm 0,59
P 1	92,32 \pm 6,18	6,28 \pm 0,41	11,33 \pm 0,10	25,21 \pm 1,02	56,48 \pm 0,32	47,66 \pm 1,12
1,25%	97,28 \pm 7,51	2,32 \pm 0,05	9,34 \pm 0,37	3,85 \pm 0,21	21,85 \pm 0,22	6,43 \pm 0,61
2,50%	97,03 \pm 8,45	2,29 \pm 0,05	9,48 \pm 0,35	4,01 \pm 0,23	21,72 \pm 0,17	6,94 \pm 0,68
5,00%	97,15 \pm 8,62	2,41 \pm 0,04	9,53 \pm 0,32	4,73 \pm 0,24	22,33 \pm 0,23	8,05 \pm 0,58
7,50%	96,77 \pm 7,84	5,1 \pm 0,05	9,55 \pm 0,35	5,19 \pm 0,25	23,25 \pm 0,19	9,11 \pm 0,61
P 2	92,30 \pm 6,03	8,37 \pm 0,58	11,44 \pm 0,0	26,50 \pm 0,04	58,17 \pm 0,24	48,98 \pm 0,03
1,25%	97,43 \pm 8,35	2,18 \pm 0,04	9,28 \pm 0,38	3,83 \pm 0,19	21,33 \pm 0,23	6,16 \pm 0,43
2,50%	97,12 \pm 8,62	2,23 \pm 0,05	9,51 \pm 0,37	4,17 \pm 0,19	21,88 \pm 0,23	7,02 \pm 0,53
5,00%	97,31 \pm 8,04	2,55 \pm 0,06	9,51 \pm 0,34	4,83 \pm 0,15	22,89 \pm 0,18	8,13 \pm 0,59
7,50%	97,12 \pm 8,17	2,66 \pm 0,07	9,65 \pm 0,31	5,36 \pm 0,17	23,75 \pm 0,22	9,15 \pm 0,65
P 3	93,02 \pm 6,68	5,19 \pm 0,87	11,47 \pm 0,04	27,59 \pm 0,19	57,07 \pm 0,71	51,01 \pm 0,71
1,25%	97,23 \pm 8,45	2,21 \pm 0,03	9,48 \pm 0,33	3,72 \pm 0,16	21,19 \pm 0,25	6,41 \pm 0,62
2,50%	97,05 \pm 8,53	2,26 \pm 0,04	9,44 \pm 0,37	4,03 \pm 0,23	21,33 \pm 0,22	7,03 \pm 0,56
5,00%	97,18 \pm 8,37	2,33 \pm 0,09	9,55 \pm 0,37	4,83 \pm 0,22	22,76 \pm 0,28	8,11 \pm 0,55
7,50%	97,15 \pm 8,62	2,43 \pm 0,07	9,65 \pm 0,34	5,54 \pm 0,19	23,77 \pm 0,25	9,36 \pm 0,58
P 4	92,47 \pm 6,53	7,28 \pm 0,74	11,50 \pm 0,00	25,14 \pm 1,27	63,50 \pm 7,78	57,00 \pm 7,07
1,25%	97,32 \pm 8,55	2,32 \pm 0,06	9,47 \pm 0,36	3,73 \pm 0,24	21,42 \pm 0,26	6,58 \pm 0,65
2,50%	97,10 \pm 8,51	2,30 \pm 0,05	9,47 \pm 0,36	4,01 \pm 0,21	22,05 \pm 0,45	7,30 \pm 0,74
5,00%	97,18 \pm 8,26	2,55 \pm 0,07	9,55 \pm 0,33	4,66 \pm 0,26	23,23 \pm 0,47	8,45 \pm 0,72
7,50%	97,10 \pm 8,41	2,61 \pm 0,08	9,62 \pm 0,31	5,19 \pm 0,29	24,25 \pm 0,75	9,71 \pm 0,94

O.M, organic matter; C.Fat, crude fat; C.P, crude protein; C.F, crude fibre; N.D.F, neutral detergent fibre; A.D.F, acid detergent fibre; P, pomace variety.

Regarding the effect of the pomace variety, it is observed that after a fermentation period of 18h (**Table II. 2**), P2 and P3 show a greater inhibitory potential for gas production with respect to barley (223,71), which has the highest values, while P1 and P4 ranked an intermediate position. Regarding CH₄ production, once again, P3 is the one with the highest inhibitory effect, while P1 and P4 show a production like barley and P2 shows a slight inhibitory effect with intermediate values.

Table II. 2.- Gas (ml/g fermented substrate) and CH₄ (ml/g fermented substrate) production after 18h of fermentation.

		Barley	P1	P2	P3	P4	<i>p</i>
G.P	Mean	223,71b	213,45ab	204,08a	201,59a	212,42ab	0,001
	s.d	11,04	8,88	18,59	17,77	11,80	
CH₄	Mean	40,28b	38,71b	37,99ab	30,14a	44,32b	0,001
	s.d	7,85	2,80	6,62	6,78	12,78	
		Barley	1,25%	2,5%	5%	7,5%	<i>p</i>
G.P	Mean	223,71b	210,74ab	206,29a	209,12ab	205,39a	0,01
	s.d	11,04	15,02	21,73	5,18	15,74	
CH₄	Mean	40,28ab	42,49b	39,79ab	36,37ab	32,51a	0,05
	s.d	7,85	12,48	40,70	3,37	5,32	

Different small letters in the same row indicate statistically significant differences between means (Dunn's test, $p < 0,05$).

P, pomace variety; %: Percentage of pomace incorporation in the pomace-barley mixture; G.P, gas production; s.d: standard deviation; *p*, *p*-value.

Regarding the kinetics of gas production (**Table II. 3**), differences ($p < 0,05$) were observed among the different pomaces, showing that up to 8h, P3 presented the highest inhibitory potential, repeating the pattern observed in the 18h fermentation (**Table II. 2**), being P1 and P4 the highest gas producers. After 10h, a change in the fermentation curve of the different substrates was observed, being barley the highest gas producer, maintaining this pattern until the end of the fermentation process, while P2 registered lower values. It should be noted that in the period from 10 to 48h, P1 shows the same gas production as barley, as does P3 from 12 to 48h. With respect to CH₄ production

significant differences were found ($p < 0,001$), P2 and P4 (44,66mlCH₄/g and 48,96 mlCH₄/g respectively) showed the greatest inhibitory potential, while P1 and P3 (56,07mlCH₄/g and 57,21mlCH₄/g respectively) do not inhibit CH₄ production, showing a production like barley (57mlCH₄/g).

Table II. 3.- Kinetics of gas production (ml/g fermented substrate) and CH₄ (ml/g fermented substrate) production after 96h of fermentation of the varieties of pomace studied.

		Barley	P 1	P 2	P 3	P 4	<i>p</i>
G.P 4h	<i>Mean</i>	7,23b	11,70c	0,69ab	0,00a	14,31c	0,001
	<i>s.d</i>	8,08	5,34	2,77	0,00	4,69	
G.P 6h	<i>Mean</i>	51,82bc	59,32c	46,26ab	40,10a	58,97c	0,001
	<i>s.d</i>	13,57	8,00	4,95	5,02	5,98	
G.P 8h	<i>Mean</i>	106,28bc	109,33c	97,40ab	96,41a	111,76c	0,001
	<i>s.d</i>	11,07	7,71	5,45	6,48	5,61	
G.P 10h	<i>Mean</i>	147,29b	145,71b	136,08a	139,86ab	145,05b	0,001
	<i>s.d</i>	10,83	8,59	5,37	6,55	6,99	
G.P 12h	<i>Mean</i>	171,85b	171,22b	160,35a	169,89b	163,51ab	0,001
	<i>s.d</i>	10,70	8,01	5,96	8,20	8,24	
G.P 24h	<i>Mean</i>	269,96b	266,00b	249,62a	259,36ab	252,22a	0,001
	<i>s.d</i>	12,24	12,84	7,86	18,71	14,31	
G.P 48h	<i>Mean</i>	312,01b	300,69b	285,26a	301,20b	297,65ab	0,001
	<i>s.d</i>	13,33	15,38	8,85	10,73	12,49	
G.P 72h	<i>Mean</i>	327,71c	321,62bc	297,20a	322,67bc	299,41ab	0,001
	<i>s.d</i>	14,63	15,03	9,99	11,23	41,98	
G.P 96h	<i>Mean</i>	337,76c	329,72bc	299,07a	324,10bc	316,51b	0,001
	<i>s.d</i>	21,20	18,44	8,74	9,31	11,22	
CH₄96h	<i>Mean</i>	57,00b	56,07b	44,66a	57,21b	48,96a	0,001
	<i>s.d</i>	7,67	3,93	2,52	2,75	3,27	

Different small letters in the same row indicate statistically significant differences between means (Dunn's test, $p < 0,05$).

P, pomace variety; G.P, gas production; s.d, standard deviation; *p*, p-value.

After 18h of fermentation (**Table II. 2**) gas production is significantly reduced ($p < 0,01$) in the mixture with 2,5% and 7,5% (206,29ml/g and 205,39ml/g respectively) compared to barley (223,71ml/g). In the study of the kinetics of gas production (**Table II. 4**), it was observed that after 10h of fermentation, the 7,5% level had an inhibitory effect on gas production compared to barley. This pattern is constant throughout time, until the end of the fermentation process, with an estimated inhibition between 5,7% and 10%. In both fermentation times, the lowest CH₄ production is observed in the 7,5% mixture while the highest values corresponded to 1,25% (**Table II. 2**) and barley (**Table II. 4**).

Table II. 4.- Kinetics of gas production (ml/g fermented substrate) and CH₄ (ml/g fermented substrate) production after 96h of fermentation of the different levels of pomace studied.

		Barley	1,25%	2,5%	5%	7,5%	<i>p</i>
G.P 4h	<i>Mean</i>	7,23	7,33	7,76	5,99	5,62	n.s
	<i>s.d</i>	8,08	8,69	7,55	7,59	6,30	
G.P 6h	<i>Mean</i>	51,82	52,34	51,88	52,42	48,01	n.s
	<i>s.d</i>	13,57	11,83	12,70	8,21	7,67	
G.P 8h	<i>Mean</i>	106,28	105,41	104,56	104,31	100,61	n.s
	<i>s.d</i>	11,07	11,78	11,32	5,71	7,13	
G.P 10h	<i>Mean</i>	147,29b	142,70ab	144,17ab	142,36ab	137,48a	0,05
	<i>s.d</i>	10,83	9,14	9,52	5,21	5,70	
G.P 12h	<i>Mean</i>	171,85b	168,50ab	166,58ab	167,97ab	161,91a	0,05
	<i>s.d</i>	10,70	11,91	9,59	5,36	5,42	
G.P 24h	<i>Mean</i>	269,96b	262,64ab	260,91ab	256,78ab	246,87a	0,001
	<i>s.d</i>	12,24	21,50	13,95	6,33	9,99	
G.P 48h	<i>Mean</i>	312,01b	298,16ab	300,86ab	297,52ab	288,25a	0,001
	<i>s.d</i>	13,33	18,49	13,09	7,21	10,13	
G.P 72h	<i>Mean</i>	327,71b	314,30ab	318,01ab	313,60ab	294,99a	0,01
	<i>s.d</i>	14,63	21,01	16,46	9,76	40,90	
G.P 96h	<i>Mean</i>	337,76b	319,23ab	324,64ab	317,09ab	308,42a	0,001
	<i>s.d</i>	21,20	17,49	21,67	11,42	12,10	
CH₄96h	<i>Mean</i>	57,00b	52,74ab	52,84ab	51,35ab	49,97a	0,05
	<i>s.d</i>	7,67	6,99	6,91	4,60	5,49	

Different small letters in the same row indicate statistically significant differences between means

(Dunn's test, $p < 0,05$). P, pomace variety; G.P, gas production; s.d, standard deviation; *p*, p-value.

The gas production values (**Figure II. 1**), P1, P2, and P3 are lower than those of the control barley (reference line) when the incorporation levels are low, P4 does not show this pattern. In the case of CH₄ production (**Figure II. 2**) this effect is not observed up to 5% of pomace in the mixture. Lowest values for gas and CH₄ production are registered by P2 and P3 respectively. If each pomace is analysed separately, it can be notice that:

P1 shows that the maximum gas production (**Figure II. 1**) is at 2,5% and then decreases al the concentration increases. Respect to CH₄ production (**Figure II. 2**) a dose-response effect is observed by decreasing CH₄ production as the concentration of P1 increases in the mixture.

P2, show the lowest gas production values (**Figure II. 1**) is at 2,5%. CH₄ production (**Figure II. 2**) is like P1.

Regarding P3, both gas production (**Figure II. 1**) and CH₄ production (**Figure II. 2**) show the same pattern. A potent inhibitory effect can be observed when P3 is at low concentrations (1,25%, 2,5%). The highest values are found at concentrations of 5%. However, concentration of 7,5% show an inhibitory effect like that observes at low percentages.

P4 has the same pattern for both, gas (**Figure II. 1**) and CH₄ production (**Figure II. 2**). A progressive decrease in the production is observed up to 5%. Higher levels do not increase the inhibitory potential.

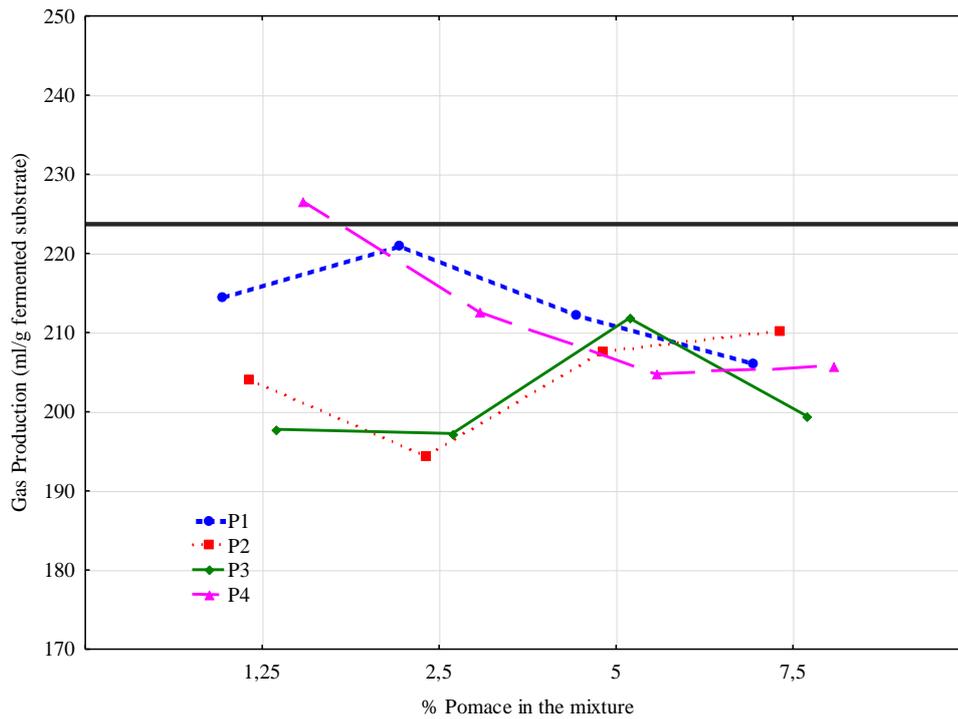


Figure II. 1.- Gas production after 18h of fermentation.

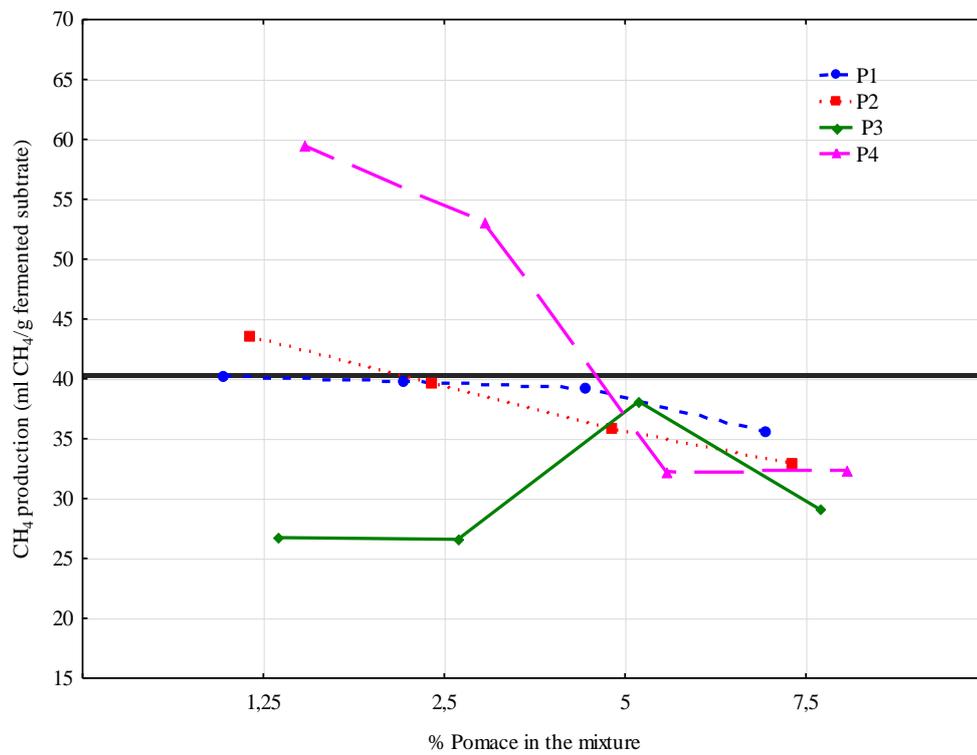


Figure II. 2.- CH₄ production after 18h of fermentation.

The parameter "a" **Table II. 5** is associated with the easily degradable fraction of the feed. This parameter reaches higher values for barley and lower for the 7,5% level. These results can be reflected in practice, since the highest gas production is registered by barley, while the lowest corresponds to the 7,5% inclusion level.

The parameter "b" corresponds to the potentially degradable fraction of the feed, in this case it can be observed that the highest value is registered for barley while the lowest value corresponds to the 7,5% inclusion level.

The addition of the parameters "a+b" would express the total degradability of the material to be fermented, it can be observed a progressive decrease as the percentage of pomace in the mixture increases, in correspondence with the obtained experimental results.

The parameter "c" is an intrinsic degradability coefficient of each product. In this case, the lowest degradability would correspond to barley and the 2,5% inclusion level, while the rest present equal values.

The parameter "tl" is considered as the fermentation initiation time and allows adjusting the equation to the real model, although it does not necessarily reflect reality, since at 4h all the pomaces have started the fermentation process.

Table II. 5.- Gas production modelling after 96h of fermentation. Parameters of the equation McDonald, (1981) $Y=a+b(1-e^{-c(t-tl)})$.

	a	b	(a+b)	c	tl	R²
Barley	131,79	200,54	323,33	0,075	9,60	0,99
1,25%	123,86	192,48	324,40	0,078	9,21	0,99
2,5%	125,92	194,57	320,49	0,076	9,42	0,99
5%	123,06	191,69	314,75	0,078	9,26	0,99
7,5%	116,71	185,31	302,02	0,078	9,16	0,99

a, soluble or degradable fraction, time 0; b, insoluble but potentially degradable fraction; c, speed or rate of degradation; tl, delay in fermentation start-up time.

4.- Discussion

The statistical analysis of the results (Kruskal-Wallis), determined by the type of data, allows us to detect the possible effect of the main factors, but not whether there are interactions. In any case, a qualitative effect associated with the type of pomace used and a quantitative effect associated with the concentration of pomace are demonstrated.

Sheep faeces were used as inoculum source for fermentation, considering the high correlation between the utilization of rumen liquid and fresh faeces to compare gas and CH₄ production between different feeds and/or treatments (Dhanoa *et al.*, 2004; Mauricio *et al.*, 2001; Ramin *et al.*, 2015). In addition, obtaining faeces is less invasive for the animal and avoids problems of scientific-ethical committees that could limit the development of research (Spanghero *et al.*, 2019).

The rumen fermentation inhibitory activity of grape pomace has been previously established (Abarghuei, 2015) and is based on the interaction of tannins with rumen microbes through different processes (Goel *et al.*, 2005; Mcsweeney *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005), such as metal chelation, which affects the functioning of metalloenzymes, or affecting the integrity of the cell wall and membrane. Furthermore, these compounds have the ability to form complexes with the carbohydrates and proteins of the substrate, decreasing the availability of fermentable substrate to rumen microorganisms (Jayanegara *et al.*, 2011; Patra and Saxena, 2010). This hypothesis is interpreted under *in vitro* fermentation conditions as a decrease in total gas (Abarghuei, 2015) and CH₄ production (Moate *et al.*, 2020) and our result support it.

Regarding the type of pomace used (**Table II. 2** and **Table II. 3**), it may be paradoxical that the results show different activity, taking in account that the pomaces are from the same grape variety (*Tempranillo*) and geographical area, but the production of tannins by the vine is a reaction to drought and cultivation conditions (Bucchetti *et al.*, 2011; Hochberg *et al.*, 2015). This could explain the observed values because the grapes come from cultivars with different levels of hydric stress, resulting in different tannin production (antimethanogenic activity).

Differences in grape processing could explain the variability in pomace activity due to the fact that content of different by-product compounds (pulp, seed, stalk), are not always in the same proportions (Hixson *et al.*, 2016)

In line with our results, Atalay (2020), also found differences for both gas and CH₄ production after an incubation period of 24h. In an *in vitro* fermentation study of different grape varieties pomaces, Sofyan *et al.* (2017) also confirmed that the presence of tannins determines a decrease in gas production, but unlike our results, they find no differences in terms of CH₄ production. Other authors such as Moate *et al.* (2014), demonstrated the reduction effect of grape by-products on CH₄ production, by substituting 36% of alfalfa hay with grape by-products, obtaining a decrease between 20-24% of CH₄ emissions in an *in vivo* study with cows.

Regarding the quantitative effect observed on gas production (**Figure II. 1**) (**Table II. 2** and **Table II. 4**), a dose-response trend is observed in the range of concentrations analysed. Sallamab *et al.* (2010), showed a clear negative correlation ($R^2=0,92$) between the total polyphenols of five plants (Atriplex, Alfalfa, Leucane, Ecucalyptus, Acacia) and the total gas production. However, this dose-response relationship also depends on the substrate, which is evident in the case of a fermentable material, but not in the case of a material of low natural degradability (Hervás *et al.*, 2003). In this study, is assumed that, since barley is the fermentative base, there must not have been any limitation to the fermentative process.

Regarding CH₄ production, on the one hand, we can observe a dose-effect pattern (**Table II. 4**) (**Figure II. 2**), according to our results, Gomaa *et al.* (2017), found differences in CH₄ production when incorporating taniferous plants in different percentages, obtaining the best results with the highest rates. Hatew *et al.* (2016), in an *in vitro* study, also obtained a linear reduction between CH₄ production and the level of tannin incorporated. Moate *et al.* (2020), clearly indicate the inhibitory action of tannins on methanogenesis determined by their chemical composition, high fat and lignin. Atalay, (2020) in an *in vitro* fermentation study, supports that the antimethanogenic effect found is due to the combination of tannins with the fat of the seeds. On the other hand, studies carried out by Gameda and Hassen, (2015) indicate that the presence of tannins has a significant effect on the production of volatile fatty acids *in vitro*.

5.- Conclusions

According to the results, it can be concluded that the incorporation of grape pomace (*Tempranillo* variety) to a concentrate type exerts an inhibitory effect on the *in vitro* production of gas and CH₄, obtaining a greater inhibitory potential with an inclusion of 7,5%.

Bibliographic References

- Abarghuei MJ, Rouzbehan Y, Alipour D (2015). The Effect of Tannins in Grape Pomace and Oak Leaf on the *in vitro* Organic Matter Digestibility and *in situ* Disappearance of Sheep. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(1), 95-103.
- Aghajanzadeh-Golshani A, Maheri-Sis N, Salamat Doust-Nobar R, Ebrahimnezhad Y, Ghorbani A (2015). Developing a modified *in vitro* gas production technique to replace the nylon bag method of evaluating protein degradation of alfalfa hay in ruminants. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5 (2), 339-345.
- Atalay A (2020). Determination of nutritive value and anti-methanogenic potential of turkish grape pomace using *in vitro* gas production technique. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 30(4), 944–949. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2020.4.0110>
- Axford RFE, Chamberlain AG (1987). Use of faecal organisms from sheep for the *in vitro* determination of digestibility. *The Journal of Agricultural Science*, 109(2), 257–259. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080667>
- Barraso C, López-Parra MM, Rodríguez PL (2021). Efecto de la variedad de orujo de uva sobre la producción de gas y metano *in vitro*. *Archivos de Zootecnia*, 70(269), 34-41. <https://doi.org/10.21071/az.v70i269.5416>
- Bhatta R, Saravanan M, Baruah L, Sampath KT, Prasad CS (2013). Effect of plant secondary compounds on *in vitro* methane, ammonia production and ruminal protozoa population. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 455–465. <https://doi.org/10.1111/jam.12238>
- Bucchetti B, Matthews MA, Falginella L, Peterlunger E, Castellarin SD (2011). Effect of

- water deficit on Merlot grape tannins and anthocyanins across four seasons. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.003>
- Damiran D, Yu P (2010). Chemical profile, rumen degradation kinetics, and energy value of four hull-less barley cultivars: comparison of the zero-amylose waxy, waxy, high-amylose, and normal starch cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10553–10559. <https://doi.org/10.1021/jf101624a>.
- Dhanao MS, France J, Crompton LA, Mauricio RM, Kebreab E, Mills JAN, Sanderson R, Dijkstra J, Ló S (2004). Technical note: A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the in vitro gas production technique using feces as the inoculum 1. *Journal of Animal Science*, 82, 733-746.
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*, 26-02-2009.
- El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ (1998). Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining in vitro digestibility and gas production For personal use only. *Canadian Journal of Animal Science*, 78, 673-679.
- Gemeda BS, Hassen A (2015). Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(2), 188–199. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0325>
- Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 92(11), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0040-7>
- Gomaa RMM, González-Ronquillo M, Arredondo-Ramos J, Castelán Ortega OA, Molina LT (2017). Effect of tanniferous plants on in vitro digestion and methane production. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(11), 371. <https://doi.org/10.19136/era.a4n11.1160>

- Hatew B, Stringano E, Mueller-Harvey I, Hendriks WH, Carbonero CH, Smith LMJ, Pellikaan WF (2016). Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on in vitro ruminal methane production and fermentation characteristics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(2), 348–360. <https://doi.org/10.1111/jpn.12336>
- Hervás G, Frutos P, Giráldez FJ, Mantecón ÁR, Álvarez Del Pino MC (2003). Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109(1–4), 65–78. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00208-6)
- Hixson JL, Jacobs JL, Wilkes EN, Smith PA (2016). Survey of the Variation in Grape Marc Condensed Tannin Composition and Concentration and Analysis of Key Compositional Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7076–7086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03126>
- Hochberg U, Degu A, Cramer GR, Rachmilevitch S, Fait A (2015). Cultivar specific metabolic changes in grapevines berry skins in relation to deficit irrigation and hydraulic behavior. *Plant Physiology and Biochemistry*, 88, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.01.006>
- Jayanegara A, Wina E, Soliva CR, Marquardt S, Kreuzer M, Leiber F (2011). Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2–4), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.11.009>
- Lassey KR (2008). Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(1–2), 114–118. <https://doi.org/10.1071/EA07220>
- MAPA (2020). Dirección general de producciones y mercados agrarios, principales indicadores económicos. <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- Mauricio RM, Owen E, Mould FL, Givens I, Theodorou MK, France J, Davies DR, Dhanoa MS (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal*

- Feed Science and Technology, 89(1-2), 33-48. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00234-0)
- McDonald I (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal Agriculture Science Cambridge*, 96, 251-252. <https://doi.org/10.1017/S0021859600032081>
- Mcsweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 83-93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00232-2)
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (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. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), 217–222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>
- Moate PJ, Williams SRO, Torok VA, Hannah MC, Ribaux BE, Tavendale MH, Eckard RJ, Jacobs JL, Auldish MJ, Wales WJ (2014). Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 5073–5087. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7588>
- Moate PJ, Jacobs JL, Hixson JL, Deighton MH, Hannah MC, Morris GL, Ribaux BE, Wales WJ, Williams SRO (2020). Effects of feeding either red or white grape marc on milk production and methane emissions from early-lactation dairy cows. *Animals*, 10(6), 976. <https://doi.org/10.3390/ani10060976>
- OIV (2019). Note de conjoncture mondiale situation du secteur en 2018. <http://www.oiv.int/public/medias/6678/gr-oiv-note-de-conjoncture-2019.pdf>
- Owens FN, Basalan M (2016). Ruminant fermentation. In *Rumenology*. 63–102 pp. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_3
- Patra AK, Saxena J (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198–1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>
- Ramin M, Lerose D, Tagliapietra F, Huhtanen P (2015). Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully

- automated in vitro gas production system. *Livestock Science*, 181, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.025>
- Rasouli B, Amiri B (2016). Nutritive Value Assessment of Three Rangeland Species Using Sheep Rumen and Feces Fluid. *Environmental Resources Research*, 4(2), 141-152.
- Sallamab SMAH, da Silva Bueno IC, de Godoy PB, Nozella EF, Vitti DMSS, Abdalla AL (2010). Ruminant fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1),1-10. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913074001>
- Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50(2), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0180-x>
- Sofyan A, Sakti AA, Herdian H, Khairulli G, Suryani AE, Karti PDMH, Jayanegara A (2017). In vitro gas production kinetics and digestibility of king grass (*Pennisetum hybrid*) added by organic mineral and natural crude tannin. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 122–125. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1129339>
- Spanghero M, Chiaravalli M, Colombini S, Fabro C, Frolidi F, Mason F, Moschini M, Sarnataro C, Schiavon S, Tagliapietra F (2019). Rumen inoculum collected from cows at slaughter or from a continuous fermenter and preserved in warm, refrigerated, chilled or freeze-dried environments for in vitro tests. *Animals*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ani9100815>
- Yu J, Ahmedna M (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Capítulo III

*Estudio del valor nutritivo de la hoja de
olivo conservada mediante pruebas de
fermentación in vitro*

En proceso de revisión

Estudio del valor nutritivo de la hoja de olivo conservada mediante pruebas de fermentación *in vitro*

Barraso C^{1,*}, López-Parra MM¹, García A³ y Rodríguez PL².

¹Departamento de Calidad de Carne, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de las Ciencias s/n, 10003, Cáceres, España.

³Departamento de Producción Animal, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

*Autor para correspondencia: carmen.barraso@juntaex.es

Resumen: los subproductos agroindustriales presentan uno de los mayores problemas medioambientales de la producción agraria. La hoja de olivo es uno de los principales subproductos obtenidos de la producción olivarera, presente en grandes volúmenes en ciertas épocas del año y cuyas características químico-nutritivas lo hacen susceptible de ser usado en la alimentación del ganado rumiante, además, contiene polifenoles, que pueden reducir las emisiones de metano ruminal. Por ello, el objetivo de este estudio fue, por un lado, evaluar el efecto que ejerce la incorporación de 2,5%, 5%, 7,5% y 10% de hoja de olivo sobre el potencial fermentativo de un concentrado tipo (cebada), y, por otro lado, diseñar un sistema de conservación basado en el ensilado mediante la combinación de diferentes niveles de urea (2%, 4% y 6%) y melaza (2%, 4% y 6%), valorando su potencial energético, fermentativo y metanogénico *in vitro*, comparándolos con el subproducto fresco y desecado. La incorporación de un 10% de hoja de olivo en el concentrado disminuyó la producción de gas y metano un 14,58% y 26,78% respectivamente. El ensilado formulado con un 2% urea y 2% melaza presentó el nivel energético más alto y muy próximo al del subproducto fresco, aumentando el porcentaje de digestibilidad *in vitro*. La producción de metano *in vitro* aumentó cuando el subproducto fue ensilado y disminuyó con el desecado.

Palabras claves: hoja olivo, producción de gas, metano, ensilado, valor energético.

Summary: agro-industrial by-products are one of the biggest environmental problems of agricultural production. Olive leaf is the main by-product obtained from olive tree production because it is generated in great volumes and on a temporary period. This by-product has chemical and nutritional characteristics that make it possible to use it as part of the diet of ruminants, in addition, it contains polyphenols, which can reduce ruminal methane emissions. The initial aim of this study was to evaluate the effect on the *in vitro* fermentative and methanogenic characteristics of the addition of different levels of olive leaves (2,5%, 5%, 7,5% and 10%) to one type of concentrate (barley). A conservation system was then designed based on olive leaf silage combining different levels of urea (2%, 4% and 6%) and molasses (2%, 4% and 6%). The fermentative, nutritive, and methanogenic potential was evaluated and compared with the original fresh and dried by-product. The incorporation of 10% olive leaves in the concentrate decreased gas and methane production by 14,58% and 26,78%, respectively. The silage formulated with 2% urea 2% molasses had the best energy value and %DMO compared to the rest of the formulations. *In vitro* methane production increased when the by-product was ensiled and decreased when it was dried.

Key Words: olive leaf, gas production, methane, energy value.

1.-Introducción

El cambio climático es uno de los principales retos medioambientales a los que se enfrenta la sociedad actual. Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) de origen antropogénico, procedentes de actividades como la agricultura y ganadería, contribuyen de manera significativa al desarrollo de dicho fenómeno (Gerber *et al.*, 2013). Dentro del sector agrario, España despunta en el cultivo del olivo, siendo el principal productor de aceite de oliva en el mundo (MAPA, 2021). Sin embargo, tanto el cultivo del olivo como la industria del aceite generan altas cantidades de subproductos al año, originando un gran volumen de biomasa con alta carga fenólica y contaminante, debido al poder tóxico y antimicrobiano que presentan estos compuestos (Dermeche *et al.*, 2013). Entre estos subproductos encontramos la hoja u hojín de olivo, obtenido tras la poda del olivo, o bien, tras la limpieza de la aceituna en las industrias transformadoras y cuyo principal componente fenólico es la oleuropeína. En cuanto a la producción ganadera, los rumiantes

producen metano (CH₄) de manera obligada a como consecuencia de la fermentación ruminal de los hidratos de carbono, siendo el principal foco de emisión de GEI del sector ganadero (MITECO, 2022). Este gas presenta un potencial de calentamiento 25 veces más alto que el dióxido de carbono (CO₂) y es el segundo GEI con mayor concentración atmosférica (IPCC, 2013; ECONOMETRICA, 2015).

Un impacto ambiental adicional de la producción ganadera viene dado por la huella de carbono asociada a la producción de los piensos compuestos (cultivo, procesamiento, transporte y efecto directo sobre la tierra) (Gerber *et al.*, 2013; Rojas-Downing *et al.*, 2017). Numerosos estudios avalan que los compuestos polifenólicos tienen capacidad de modificar la fermentación ruminal, debido al efecto que generan sobre los ecosistemas microbianos, reduciendo la producción de CH₄ ruminal y, con ello, la pérdida energética aportada por el alimento (Mcsweeney *et al.*, 2001; Patra y Saxena, 2010; Alayón-Gamboa *et al.*, 2018). En este escenario, el uso de subproductos agroindustriales como ingredientes en dieta de rumiantes, podría representar un componente importante de la estrategia global para reducir el impacto ambiental, tanto de la agroindustria como de la producción ganadera. Así pues, nos encontramos en un país netamente productor de aceite de oliva, con generación de subproductos, que suponen una repercusión medioambiental negativa que, a su vez, por su contenido en polifenoles, presenta potencialidad en el objetivo de reducir la producción de CH₄ ruminal.

Por lo tanto, nuestro estudio presenta dos objetivos principales. El primero, determinar el efecto que ejerce de la incorporación de hoja de olivo en diferentes concentraciones sobre las características fermentativas de un concentrado tipo (cebada), mediante la técnica de producción de gas y CH₄ *in vitro*. El segundo, diseñar un sistema de conservación del subproducto basado en el proceso de ensilado mediante la combinación de diferentes concentraciones de urea y melaza, analizar su valor energético, producción de gas y CH₄, mediante la técnica de producción de gas *in vitro* y compararla con el subproducto fresco y desecado.

2.-Material y métodos

Preparación de muestras

Tras la recepción del subproducto en el laboratorio, fue desecado en una estufa de ventilación forzada (Indelab-DIL FI720), a 65°C, para determinar su contenido en humedad y facilitar su molienda en un molino ciclónico (Rescht ZM200) con tamiz de 1mm.

Sistema de mezclas cebada-hoja de olivo

Para realizar las mezclas, se establecieron cuatro niveles de incorporación del subproducto desecado al concentrado: 2,5%, 5%, 7,5% y 10%. El proceso de mezcla se llevó a cabo con una amasadora doméstica, tras haber realizado pruebas previas para determinar el tiempo óptimo de mezcla.

Elaboración de ensilados

Para la elaboración de los ensilados se diseñó un sistema factorial 3x3 donde se combinaron 3 niveles de urea (2%, 4% y 6%) y 3 niveles de melaza (2%, 4% y 6%), dando lugar a 9 ensilados experimentales más 1 control (sin aditivo). Los niveles de ambos aditivos fueron establecidos en función de la bibliografía consultada (Schiere *et al.*, 1988; Aguilera *et al.*, 1997; Wrathall *et al.*, 1989). Tanto la urea como la melaza fueron calculadas en base a la materia seca del subproducto y se incorporó agua hasta alcanzar una humedad final del 30%.

Para la fabricación de cada ensilado experimental, se procedió a pesar 325g del subproducto fresco y posteriormente se le incorporó con un aspersor manual la solución urea-melaza correspondiente en cada fórmula, mezclando manualmente hasta que todo el material quedó bien impregnado. Finalmente fue envasado doblemente al vacío en bolsas de 35x20cm y 40x30cm asegurando una anaerobiosis total donde permanecieron durante un periodo de 42 días a temperatura ambiente.

Análisis químico de las mezclas y ensilados experimentales

Las muestras se analizaron siguiendo el Reglamento CE 152/2009 (EC, 2009) para materia orgánica (M.O), grasa bruta (G.B), proteína bruta (P.B), fibra bruta (F.B), fibra neutro detergente (F.N.D), fibra ácido detergente (F.A.D) y lignina ácido detergente (L.A.D).

Proceso de fermentación in vitro: producción de gas

El proceso de fermentación *in vitro* se llevó a cabo mediante la técnica propuesta por (Menke *et al.*, 1979). Para ello se utilizaron jeringas de vidrio de 120ml de capacidad con punta tipo Luer. Se midió el desplazamiento del émbolo producido por el gas de fermentación. La punta Luer se cerró con una válvula de tres vías que garantiza un cierre hermético y permite acoplar distintos dispositivos de medida. Como fuente de inóculo para la fermentación, se utilizaron heces recogidas directamente del recto de ovejas (El Shaer *et al.*, 1987) pertenecientes a la Finca la Orden-Valdesequera (CICYTEX), inmediatamente antes del inicio del proceso. Este sistema evita las objeciones que pueden hacer los comités éticos de experimentación animal (Spanghero *et al.*, 2019) a la vez que presenta una buena correlación con los métodos que utilizan líquido ruminal (Ramin *et al.*, 2015).

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Fabricación de saliva artificial a partir de cuatro soluciones (Aghajanzadeh *et al.*, 2015): solución macromineral, solución tampón, solución reductora y solución micromineral.
- Elaboración de líquido fecal, mezclando homogéneamente 1000ml de saliva artificial con 166g de heces frescas.

Para el ensayo de mezclas cebada-hoja de olivo se instalaron un total de 4 gradillas en condiciones equivalentes, donde cada gradilla cuenta con un total de 12 jeringas, dispuestas de tal modo que, 2 jeringas actúan como blanco (30ml de líquido fecal), otras 2 actúan de testigo: en el caso de las mezclas se utilizó 0,2g de cebada, para los ensilados 0,2g de ensilado control y para el subproducto fresco y desecado 0,2g de alfalfa. Las ocho jeringas restantes contienen como sustrato fermentador 0,2g de la mezcla de estudio (n=8).

Las muestras fueron incubadas a 39°C durante 24h, ya que es el periodo estimado para poder calcular el valor energético (Menke y Steingass, 1995). Trascurrido este tiempo, se midió el desplazamiento del émbolo producido por el gas de fermentación, así como el porcentaje de CH₄ producido por los sustratos fermentados.

Predicción del valor energético

El valor energético se estimó a partir de los resultados de composición química y producción de gas *in vitro* tras 24h, aplicando las ecuaciones propuestas originalmente por Menke y Steingass (1988), convenientemente contrastadas en otras publicaciones de su equipo de investigación (Krishnamoorthy *et al.*, 1995), y adaptadas específicamente al tipo de sustrato utilizado, en este caso un subproducto, se calculó la energía metabolizable (EM) expresada como Mcal/kg m.s y el porcentaje de digestibilidad de la materia orgánica (%DMO).

$$EM = (1,06 + 0,1570P.G + 0,0084P.B + 0,022G.B - 0,0081C) / 4,184$$

$$\%DMO = 0,9991P.G + 0,0595PB + 0,0181C + 9$$

P.G = ml gas /0,2mg; P.B = proteína bruta (g/kg ms), G.B = grasa bruta (g/kg ms), C= cenizas (g/kg ms).

La predicción del valor energético se realizó tanto para los ensilados experimentales, como para el subproducto original fresco y desecado. Dado que el nivel de producción de gas obtenido a partir de heces es menor que cuando se utiliza líquido ruminal (Ramin *et al.*, 2015). El nivel de producción de gas se corrigió en función del nivel esperado para la alfalfa (30,8ml/0,2g), el cual, se corresponde con un nivel de EM de 1780kCal/kg m.s.

Medida de la producción final de CH₄.

La medida de la producción de CH₄ se llevó a cabo al terminar la prueba de fermentación, tras 24h, mediante un detector de gases GMI PS200. Este detector determina el porcentaje de CH₄ en el gas producido. Para su medición utilizamos un sistema de circuito cerrado de gases, donde conducimos a un bote Duran de 500ml el gas generado en el interior de las jeringas. La concentración final se expresó como ml de CH₄/g de material fermentado.

Estudio estadístico

El posible efecto de la incorporación de diferentes niveles de subproducto sobre las características fermentativas de la cebada se ha llevado a cabo mediante una prueba de Kruskal-Walis, dado que la variable primaria, porcentaje de CH₄, no tiene una distribución normal. En el caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), las diferencias entre medias se establecieron *a posteriori* mediante una prueba de Dunn un nivel de significación preestablecido en $p < 0,05$.

En cuanto al estudio estadístico del posible efecto ocasionado por los diferentes niveles de incorporación de urea y melaza en la formulación de los ensilados experimentales se abordó mediante un ANOVA factorial, ya que este tipo de análisis nos permite detectar las posibles interacciones entre los factores de estudio. En el caso de detectar diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey *a posteriori* con un nivel de significación preestablecido en $p < 0,05$.

Todos los análisis se han llevado a cabo mediante el software SPSS V22.

3.-Resultados

Para determinar la calidad del subproducto y las diferentes mezclas elaboradas en base a la cebada, analizamos su composición química. Los valores medios de los componentes químicos se representan en la **Tabla III. 1**. Respecto a los resultados obtenidos para la hoja de olivo, podemos observar que su principal componente es la F.N.D (46,20%) altamente lignificada (18,7%). El contenido en M.O ronda el 96%, con valores de G.B y P.B de 6% y 10,74% respectivamente. En cuanto a la cebada de estudio, presenta un 97,38% de M.O, con un nivel de P.B en torno a 9,5%, un bajo contenido en G.B (2,17%), F.N.D y F.A.D (20,85% y 5,87% respectivamente) con ligero grado de lignificación (1,12%). Lógicamente a las mezclas (cebada + hoja de olivo), heredan la composición correspondiente en función del porcentaje de subproducto incorporado.

Se determinó la producción de gas y CH₄ mediante la prueba de fermentación *in vitro* tras un periodo de incubación de 24h, los resultados se recogen en la **Tabla III. 2**.

Tabla III. 1.- Análisis químico de las mezclas cebada/hoja de olivo (expresadas en % de materia seca).

	% Cebada / Hoja de Olivo					
	100/0	0/100	97,5/2,5	95/5	92,5/7,5	90/10
M.O	97,38±2,64	95,39±0,92	97,1±2,58	97,2±2,34	97,40±2,46	96,90±2,50
G.B	2,17±0,03	6,00±0,71	2,30±0,05	2,40±0,05	2,60±0,06	2,70±0,10
P.B	9,41±0,36	10,74±0,18	10,62±0,38	10,62±0,33	10,62±0,35	10,62±0,43
F.B	3,54±0,19	19,86±0,27	3,60±0,18	4,50±0,22	5,00±0,20	5,50±0,22
F.N.D	20,85±0,19	46,20±3,33	16,30±0,29	16,20±0,43	14,30±0,41	17,90±0,50
F.A.D	5,87±0,59	37,95±2,23	6,90±0,61	8,00±0,76	7,10±0,73	9,20±0,84
L.A.D	1,12±0,13	18,7±1,82	1,80±0,16	2,50±0,22	2,50±0,26	3,20±0,31

M.O, materia orgánica; G.B, grasa bruta; F.B, fibra bruta; F.N.D, fibra neutro detergente; F.A.D, fibra ácido detergente; P.B, proteína bruta; L.A.D, lignina ácido detergente.

Tabla III. 2.- Producción de gas (ml/g sustrato fermentado) y CH₄ (mlCH₄/g sustrato fermentado) tras 24h de incubación, expresadas por su media ± desviación típica.

%Cebada/Hoja Olivo	Producción de gas	CH ₄
100/0	295,01ab ± 14,47	19,35a ± 1,65
97,5/2,5	301,22a ± 6,81	18,07a ± 0,41
95/5	287,74b ± 10,35	18,73a ± 2,46
92,5/7,5	286,63b ± 6,24	17,93a ± 2,19
90/10	251,99c ± 2,15	14,17b ± 1,87
<i>p</i>	0,000	0,002

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (test de Dunn, $p < 0,05$).

p, p-valor; CH₄, producción de metano.

En cuanto a la producción de gas (**Tabla III. 2**), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las mezclas de estudio, los valores más bajos se registraron cuando el subproducto fue incorporado en niveles del 10% (251,99ml/g), en tanto que la mayor producción de gas se observó en los niveles más bajos de subproducto en la mezcla (301,22ml/g), muy próximos a los valores registrados por el concentrado de referencia (295,01ml/g). El resto de las mezclas (5% y 7,5%) presentan valores intermedios (287,74ml/g y 286,63ml/g) entre los niveles superiores e inferiores de incorporación del subproducto en la mezcla.

La producción de CH₄ a las 24h (**Tabla III. 2**) fue significativamente menor ($p < 0,05$) en las mezclas que contenían un 10% del subproducto, presentando una reducción en torno al 23,5% respecto al resto de mezclas de estudio.

Referente a los ensilados experimentales, se realizó un análisis de la composición químico-nutritiva, cuyos resultados se presentan en la **Tabla III. 3**.

Obtuvimos unos valores medios de M.O: 88,64%. La G.B rondó en torno al 6,10% y el valor medio de fibra fue 24,48%, 45,19% y 34,21% para la F.B, F.N.D y F.A.D respectivamente. Los valores de P.B fluctuaron entre los diferentes ensilados, siendo superior el contenido en P.B en aquellos que contenían un 6 % de urea (20,35%, 23,83% y 22,19%).

Tabla III. 3.- Composición químico-nutritiva de los ensilados de hoja de olivo (expresadas en % de materia seca).

u*m	M.O	G.B	P.B	F.B	F.N.D	F.A.D	L.A.D
0*0	88,95±0,74	6,52±0,11	9,28±1,07	22,57±0,28	45,84±1,18	37,02±1,08	24,41±0,18
6*6	89,12±0,65	6,16±0,46	20,35±2,54	20,95±0,49	43,46±0,84	35,71±0,01	24,59±0,25
4*6	87,76±0,18	7,08±0,49	17,75±0,19	22,66±0,35	46,30±0,422	38,18±2,57	24,29±0,18
2*6	89,33±1,70	6,30±0,42	14,10±0,15	20,97±0,18	46,36±0,82	35,23±2,12	24,26±0,15
6*4	89,34±0,79	5,73±0,13	23,83±0,50	21,03±0,42	44,47±0,92	35,67±0,42	23,77±0,15
4*4	88,38±0,88	6,22±0,04	18,35±0,17	21,86±0,33	45,10±1,10	37,01±0,91	25,21±0,20
2*4	89,50±0,86	5,96±0,46	13,60±0,12	21,55±0,41	46,49±0,14	36,22±0,20	24,46±0,13
6*2	87,71±0,65	5,60±0,70	22,19±0,13	20,95±0,47	44,81±0,03	35,47±1,40	25,41±0,15
4*2	88,89±0,66	6,45±0,13	13,29±0,11	20,59±0,30	44,38±0,47	34,92±1,12	23,66±0,18
2*2	87,39±1,11	5,03±0,71	13,55±0,21	21,66±0,62	44,68±0,21	36,73±0,13	25,33±0,10

u*m, porcentaje de urea y melaza; M.O, materia orgánica; G.B, grasa bruta; F.B, fibra bruta; F.N.D, fibra neutro detergente; F.A.D, fibra ácido detergente; P.B, proteína bruta; L.A.D, lignina ácido detergente.

El potencial fermentativo, así como el valor energético de los ensilados experimentales formulados con diferentes concentraciones de urea y melaza, fue analizado mediante la prueba de producción de gas *in vitro*, y cuyos resultados se muestran en la **Tabla III. 4**. Se observó un efecto significativo ($p < 0,001$) de ambos factores de estudio, tanto individual como conjunto sobre las variables de estudio P.G, %DMO, EM y CH₄.

De este modo, la incorporación de un 2% urea registró los mayores valores de producción de gas, %DMO, EM y CH₄, mientras que en los ensilados que contenían un 4% de urea presentaron los valores más bajos de %DMO, EM, CH₄ y concentraciones del 6% de urea registraron valores intermedios para estas tres variables. En el caso de la producción de gas, no se obtuvieron diferencias entre la incorporación del 4% y 6% de urea con valores de 70,84ml/g y 73,98ml/g respectivamente.

Tabla III. 4.- Efecto de la urea y la melaza sobre las características fermentativas y valor energético *in vitro* de los ensilados de hoja de olivo.

%Urea	P.G.		%DMO		EM		CH ₄	
	Media	d.t	Media	d.t	Media	d.t	Media	d.t
2	103,79a	15,75	53,50a	5,33	1,90a	0,17	4,53a	1,47
4	70,84b	19,44	44,30c	6,85	1,58c	0,26	2,64c	0,89
6	73,98b	26,92	48,64b	8,81	1,70b	0,36	3,33b	1,61
<i>p</i>	0,000		0,000		0,000		0,000	
%Melaza								
2	73,90b	38,73	45,31b	11,38	1,57b	0,41	2,87b	1,85
4	82,94ab	13,14	49,44a	5,44	1,76a	0,20	3,15b	0,82
6	91,76a	14,19	51,70a	4,02	1,87a	0,09	4,48a	1,34
<i>p</i>	0,000		0,000		0,000		0,000	
Urea*melaza								
2*2	118,27a	10,52	58,41a	3,47	2,01a	0,13	5,02ab	0,62
2*4	87,19bcd	9,64	47,84bc	3,18	1,72bc	0,12	2,72c	0,37
2*6	105,91ab	7,20	54,31ab	2,38	1,97ab	0,09	5,85a	0,74
4*2	65,18e	31,20	40,45de	10,30	1,45ed	0,39	2,37c	1,49
4*4	68,59de	9,03	44,68cd	2,98	1,57cd	0,11	2,56c	0,25
4*6	78,74cde	8,54	47,79bc	2,82	1,72bc	0,11	2,99c	0,29
6*2	38,25f	7,43	37,06e	2,46	1,23e	0,09	1,23d	0,09
6*4	93,04bc	4,55	55,84a	1,50	1,98ab	0,06	4,17b	0,44
6*6	90,63bc	10,63	53,02ab	3,51	1,90ab	0,13	4,59b	0,79
<i>p</i>	0,000		0,000		0,000		0,000	

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (test de Tukey-b, $p < 0,05$). P.G, producción de gas expresada ml/g de sustrato fermentado; %DMO, porcentaje de digestibilidad de materia orgánica; EM, energía metabolizable, expresada como Mcal/kg.m.s; CH₄, producción de metano, expresada como ml CH₄/g sustrato fermentado; *p*, p-valor.

Respecto a la melaza, la producción de gas presentó una respuesta lineal positiva al aumentar su concentración de melaza en la fórmula, registrando valores de 73,09ml/g en concentraciones del 2%, 82,94ml/g para el 4% y de 91,76ml/g en concentraciones del 6%. Por otro lado, hallamos un aumento del %DMO y EM (5,26% y 0,24 Mcal/kg.m.s) al incorporar melaza al 4% y 6% frente al 2%. Respecto al potencial metanogénico, se observa un aumento en la producción de CH₄ al incorporar melaza al 6% (4,48mlCH₄/g) frente a niveles del 2% y 4% (3,01mlCH₄/g).

El análisis factorial reveló una interacción significativa entre ambos factores de estudio ($p < 0,001$). De este modo, observamos que la combinación de los niveles más bajos de urea y melaza (2% y 2%) registró la mayor producción de gas (118,27ml/g), en tanto que la menor, se obtuvo al combinar 6% urea y 2% melaza (38,25ml/g).

El mayor %DMO se observó en las combinaciones 2% urea y 2% melaza y 6% urea 4% melaza (58,41% y 55,84% respectivamente), mientras que la combinación 6% urea y 2% melaza reveló un descenso de la digestibilidad con valores en torno al 37%.

Los niveles más altos de EM se registraron en los ensilados con un 2% urea y 2% melaza (2,01Mcal/kg m.s), mientras que los más bajos correspondieron a la combinación de 6% urea y 2% melaza (1,23Mcal/kg m.s).

La mayor producción de CH₄ se obtuvo en la combinación 2% urea y 6% melaza, con una producción de 5,85mlCH₄/g, aunque con valores muy próximo a los obtenidos al combinar 2% urea y 2% melaza (5,02mlCH₄/g), por otro lado, fue la combinación 6% urea y 2% melaza la que registró los valores más bajos (1,23mlCH₄/g).

En la **Tabla III. 5** se recogen los resultados referentes al subproducto fresco (H.F), desecado (H.D.), ensilado control (EC) (sin aditivos) y mejor ensilado experimental (E). El mayor nivel energético correspondió a H.F (2,07Mcal/kg.m.s), aunque con una diferencia de apenas 0,06 puntos con E (2,0 Mcal/kgm.s). Por otro lado, el subproducto desecado presentó los niveles más bajos de EM, reduciéndose en torno a un 11,12% su valor energético frente al subproducto fresco.

En cuanto al %DMO de la hoja de olivo, se obtuvo una mejora en torno al 9,5% cuando el subproducto fue ensilado con un 2% urea y 2% melaza (E), y disminuyó en torno a un 12% cuando se le aplicó el tratamiento de desecado (H.D).

Respecto a la producción de CH₄, observamos que E presenta los mayores valores (5,02mlCH₄/g), seguido EC (3,86mlCH₄/g), H.F (2,49mlCH₄/g) y finalmente H.D (1,72mlCH₄/g).

Tabla III. 5.- Valor energético y producción de gas y CH₄ *in vitro* del subproducto hoja de olivo ensilado, fresco y desecado.

	P.G		EM		%DMO		CH ₄	
	Media	d.t	Media	d.t	Media	d.t	Media	d.t
E	118,27a	10,52	2,01ab	0,13	58,41a	3,47	5,02a	0,62
EC	103,09bc	8,47	1,85bc	0,16	50,57bc	4,23	3,86b	0,83
H.F	111,10ab	8,72	2,07a	0,11	52,92b	2,80	2,49c	0,21
H.D	91,90c	12,80	1,84c	0,11	46,58c	2,88	1,72d	0,23
<i>p</i>	0,000		0,000		0,000		0,000	

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (test de Dunn, $p < 0,05$). E, ensilado experimental (2%urea*2%melaza); EC, ensilado control, sin aditivos; H.F, hoja de olivo fresca; H.D, hoja de olivo desecada; *p*, p-valor; P.G, producción de gas, expresada ml/g de sustrato fermentado; EM, energía metabolizable, expresada como Mcal/kgm.s; %DMO, porcentaje de digestibilidad de materia orgánica. CH₄: producción de metano, expresada como ml CH₄/g sustrato fermentado.

4.-Discusión

Uno de los problemas que presenta la utilización de subproductos como ingredientes de la dieta de animales, es la variabilidad de la composición químico-nutritiva, la cual, viene determinada por varios factores, que, en el caso de la hoja de olivo, pueden ser las condiciones de almacenamiento, la climatología, el contenido de humedad y el grado de contaminación con tierra y aceites. Esta variabilidad la encontramos al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, como García *et al.* (2003), quienes encontraron valores más bajos para M.O, P.B, G.B, F.N.D y F.A.D, y ligeramente superiores para L.A.D. Por otro lado, Lee *et al.* (2021), obtuvieron valores de M.O y P.B similares a los nuestros (94,59 y 10,87 respectivamente), un nivel de G.B ligeramente superior y un contenido en fibra inferior. Aunque los resultados

evidencian que el nivel de proteína de este subproducto es relativamente alto, hay que tener en cuenta que la mayor parte de esta proteína se encuentra ligada a la pared celular, lo cual, la convierte en una proteína poco digestible (FEDNA, 2015).

Existe poca información acerca de los efectos que ejerce la hoja de olivo y otros subproductos procedentes de la industria oleica sobre la fermentabilidad *in vitro* y la producción de CH₄. Sin embargo, algunos estudios han identificado que los compuestos polifenólicos ejercen un efecto nocivo sobre los microorganismos ruminales, especialmente sobre los metanógenos. Este efecto se traduce en, una modificación del patrón fermentativo del rumen, causando una reducción en la producción de gas y CH₄ (Patra y Saxena, 2010). Las hojas de olivo contienen compuestos polifenólicos, siendo la oleuropeína el principal polifenol presente en este subproducto (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Este efecto inhibitorio podría explicar el comportamiento encontrado tanto en la producción de gas como en la producción de CH₄ (**Tabla III. 2**). Resultados similares fueron encontrados por Shakeri *et al.* (2016), quienes observaron un efecto inhibitorio de la producción de CH₄ *in vitro* entre un 10-15% al fermentar hoja de olivo en comparación con un concentrado control. Lee *et al.* (2021), también obtuvieron una reducción significativa en la producción de CH₄ *in vitro* al incorporar hoja de olivo al 5% tras un periodo de incubación de 12 horas.

Por otro lado, la naturaleza fibrosa del subproducto, combinada con el efecto inhibitorio de la fermentación de los taninos, podría ser responsable del comportamiento observado en la producción de gas (**Tabla III. 2**), ya que a medida que la concentración de carbohidratos solubles disminuye en la dieta, la producción de gas también se reduce en las primeras 24h de incubación (Al-Masri, 2013). En esta línea, Al-Masri (2017) encontró una correlación negativa entre el contenido en L.A.D y la producción de gas en un estudio de fermentación *in vitro* de subproductos de arbustos perennes. Nuestros resultados presentan una tendencia similar a los estudios de Al-Masri (2017) siguiendo el siguiente patrón en función del nivel de LAD: $P_{GAS} = 327,340 - 19,29 * LAD$ ($r = -0,805$).

Sin embargo, la mezcla que contiene un 2,5% del subproducto presenta los mayores niveles de producción de gas, aunque próximos a los que presenta la cebada de referencia, no viéndose reflejado el efecto descrito anteriormente. Este comportamiento, puede ser debido a la baja concentración del subproducto en la mezcla, el cual, no tiene

potencial suficiente para ejercer efecto sobre la variable producción de gas por ninguna de las dos vías propuestas. Este fenómeno también fue observado por Barraso *et al.*, (2021), en un estudio de mezcla cebada-orujo de uva.

Por otro lado, el empleo de aditivos como la urea y la melaza en la elaboración de ensilados es bastante común. La urea es una fuente de nitrógeno no proteico (NNP), cuya función principal en la elaboración de ensilados radica en la mejora de la calidad nutricional de materias primas con alto contenido en carbohidratos fibrosos por una doble vía. Por una parte, la urea se hidroliza, convirtiéndose en amoníaco, y ejerce un efecto disociador de los complejos lignina-hemicelulosa, produciéndose una solubilización de una parte de las hemicelulosas a lo largo del proceso de fermentación en el ensilado (Slanac, 2019; Rodríguez *et al.*, 2002). Según el INRA (2007), esto se refleja en la relación entre F.B y F.N.D, de tal modo que, para un mismo contenido de F.B el contenido en F.N.D es ligeramente más alto en forraje verde y un poco más bajo en el forraje fermentado (ensilado). Sin embargo, nuestros resultados no siguen este patrón para ninguno de los componentes fibrosos analizados (**Tabla III. 3**), manteniéndose los valores semejantes a los del subproducto sin ensilar (**Tabla III. 1**). En todo caso, el efecto habría que buscarlo más en el incremento del valor nutritivo que en la variación en la composición química (Molina *et al.*, 2003).

En segundo lugar, la presencia de urea se traduce en un aumento de los niveles de P.B de los ensilados de materiales naturalmente pobres en nitrógeno, que está perfectamente reflejado en la **Tabla III. 3**. Este mismo comportamiento fue observado por otros autores como Phesatcha y Wanapat (2016) y Azhary *et al.* (2020). Además, este NNP podrá ser utilizado por los microorganismos ruminales para la síntesis de proteína microbiana (Molina *et al.*, 2003; Owens y Zinn, 1988).

En cuanto a la melaza, es habitual su utilización en el ensilado de subproductos vegetales fibrosos, al incrementar la disponibilidad de carbohidratos solubles que facilitan la acción de los lactobacilos (Wang *et al.*, 2017), en especial cuando el nivel de nitrógeno del material a fermentar tiende a producir amoníaco, al facilitar, igualmente, la bajada del pH (Mordenti *et al.*, 2021).

Referente a los resultados mostrados en la **Tabla III. 4**, hay que tener en cuenta la existencia de dos variables de carácter primario: producción de gas y CH_4 , determinadas directamente en las condiciones experimentales, en tanto que el contenido energético y el %DMO no derivan, solamente, de la producción de gas, (Getachew *et al.*, 1998). Los valores de producción de gas acumulados tras un periodo de fermentación de 24h indican diferencias en el potencial fermentativo de los diferentes tratamientos, (**Tabla III. 4**).

Respecto al efecto de la urea, cabría esperar un comportamiento dosis-respuesta, aumentando la producción de gas a concentraciones crecientes de urea, sin embargo, los resultados no muestran esta tendencia, correspondiendo los mayores valores de producción de gas al 2% de urea. Salem *et al.* (2013) obtuvieron una reducción en todos los parámetros asociados a la producción de gas *in vitro* con la presencia de urea. Este efecto podría ser debido a la formación de amoníaco (NH_3) resultante de la fermentación de la P.B, debido a que el NH_3 interviene en el equilibrio del tampón bicarbonato neutralizando los iones H^+ y reduciendo la liberación de CO_2 , dando lugar a una disminución de la producción de CH_4 (Cone y Van Gelder, 1999).

El comportamiento observado para el %DMO y EM podría ser debido al incremento de nivel de P.B observado en la **Tabla III. 3** al pasar de concentraciones del 4% de urea al 6%, ya que interviene directamente en el cálculo de ambas variables. Montiel (2013), obtuvo una respuesta similar a la nuestra al analizar la digestibilidad *in vitro* de granos de sorgo ensilados con diferentes niveles de urea, donde la digestibilidad pasó del 74,2% (2% urea) al 58% (4% urea).

Finalmente, la producción de CH_4 , sigue un patrón similar al del %DMO y EM, de manera que disminuye al pasar la urea del 2% al 4% y se incrementa al pasar del 4 al 6%. Este efecto inhibitorio de la urea en niveles del 4%, podría ser debido a la formación de NH_3 (Zhang *et al.*, 2018), mientras que el repunte en la producción de CH_4 con el 6% de urea cabría explicarlo por un incremento en los niveles de pH, que se corresponden con una mayor producción de CH_4 (Van Kessel y Russel, 1999).

En cuanto al efecto que ejerce la melaza sobre el potencial fermentativo del ensilado de hoja de olivo, podría ser explicado por la naturaleza química del aditivo, rico en azúcares como la glucosa y la fructosa, siendo una fuente de hidratos de carbono de

fácil fermentación para los microorganismos (Salem *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018) los valores de %DMO y EM se incrementan de manera proporcional a dicha producción de gas, al igual que el CH₄, siguiendo una tenencia habitual en este tipo de pruebas (Blummel *et al.*, 2005).

Respecto a las interacciones detectadas (**Tabla III. 4**), podrían deberse a las variaciones en el pH resultantes de la combinación de NH₃ (tendencia al aumento) y ácidos grasos volátiles producidos (tendencia a la bajada) existentes en cada caso (Navarro *et al.*, 2011).

Referente a los resultados obtenidos en la **Tabla III. 5**, el aumento de la producción de gas en H.F frente a H.D, cabría explicarlo por a la pérdida de valor nutritivo ocasionada durante el proceso de desecación, en especial cuando el secado es en estufa, aunque sea a baja temperatura (Martín y Molina, 2008).

En cuanto a la mayor producción de gas del ensilado experimental (E) frente al ensilado control (EC) y el subproducto fresco (H.F), se justificaría por la incorporación de los aditivos urea y melaza ya que, como se ha citado anteriormente, ambos aditivos ejercen efecto mejorante directo sobre la digestibilidad de los hidratos de carbono fibrosos, además de ser una fuente de azúcares fácilmente fermentables (Slanac *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2002; INRA, 2007). Este comportamiento también se ve reflejado en el %DMO y explicaría las diferencias encontradas entre E y EC. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (Martín y Molina, 2008), podemos observar que, excepto el caso de E, nuestros valores de %DMO son inferiores, especialmente en el caso del subproducto desecado (H.D), lo que induce a pensar que la desecación produce algún tipo de modificación química que reduce la degradabilidad de la materia orgánica o bien porque se incrementa la actividad de los polifenoles (Cavaca *et al.*, 2020).

El valor de EM, como previamente se ha indicado, depende, en buena medida, de la producción de gas, lo que queda reflejado en el mayor contenido energético de E y H.F.

Finalmente, respecto a la producción de CH₄ no se observa una producción proporcional a la producción de gas. Este efecto podría ser debido a una inactivación de los taninos durante el proceso de ensilado, ocasionado por las condiciones de anaerobiosis y la bajada de pH (McSweeney *et al.*, 1999). Otros autores han descrito que la urea ejerce

un efecto sobre la estabilidad de los complejos tanino-proteínas y provoca la oxidación de los compuestos polifenólicos, inhibiendo su efecto antinutritivo (Russell y Lolley, 1989), y, por ende, su efecto antimetanogénico, lo cual, explicaría las diferencias encontradas entre E y EC. Por otro lado, y como se ha citado anteriormente el proceso de desecado podría influir sobre la actividad de los polifenoles (Cavaca *et al.*, 2020), lo cual explicaría el efecto antimetanogénico del H.D, observándose la misma respuesta en la **Tabla III. 2**, al incorporar el subproducto desecado a concentraciones del 10%.

5.-Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que la incorporación del subproducto hoja de olivo desecada a un concentrado tipo, ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de gas y CH₄ *in vitro*, y, este efecto podría ser debido a las características intrínsecas del subproducto, así como a la concentración del subproducto en la mezcla, obteniendo los mejores resultados en concentraciones del 10%.

La conservación del subproducto mediante ensilado incorporando un 2% de urea y un 2% de melaza, mejora ligeramente el %DMO *in vitro* del subproducto, presentando un valor de EM similar al subproducto fresco. Referente a la producción de CH₄, se incrementa cuando el subproducto es conservado mediante ensilado y disminuye cuando es desecado.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto COPLAGAN de I+D+i a desarrollar en el marco del programa operativo. FEDER EXTREMADURA 2014-2020. Agradecemos a M^a Jesús Guerrero, su inestimable colaboración en la realización de este trabajo en el laboratorio.

Referencias bibliográficas

- Aghajanzadeh A, Maheri N, Salmat R, Ebrahimnezhad Y, Ghorbani A (2015). Developing a modified in vitro gas production technique to replace nylon bag method of evaluating protein degradation of alfalfa hay in ruminants. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(2), 339-345. Disponible en: http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_513320_ea5c5170bab82dbce79f13399e6fbf36.pdf. (Consultado: mayo 2022).
- Aguilera A, Pérez-Gil F, Grande D, De la Cruz I, Juárez J (1997). Digestibility and fermentative characteristics of mango, lemon and corn stover silages with or without addition of molasses and urea. *Small Ruminant Research*, 26(1-2), 87-91. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(96\)01001-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(96)01001-2)
- Alayón-Gamboa JA, Jiménez-Ferrer G, Piñeiro-Vázquez ÁT, Canul-Solís J, Albores-Moreno S, Villanueva-López G, Nahed-Toral J, Ku-Vera JC (2018). Estrategias de mitigación de gases de efecto invernadero en la ganadería. *Agroproductividad* 11(2), 9-15. Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/112/100>. (Consultado: mayo 2022).
- Al-Masri MR (2013). Nutritive evaluation of some native range plants and their nutritional and anti-nutritional components. *Journal of Applied Animal Research*, 41(4), 427-431. <https://doi.org/10.1080/09712119.2013.792733>
- Al-Masri MR (2017). In vitro rumen fermentation kinetics and nutritional parameters of some native range plants and their relationships to gas production. *Livestock Research for Rural Development*, 29(12). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd29/12/asci29226.html>. (Consultado: mayo 2022).
- Azhary N, Yetti M, Mardiaty Z, Anwar K, Fauzia A, Nurul H, Noersidiq A, Marlida Y, Zain M, Kasim A, Agustin F, Huda N (2020). The Effect of Urea Levels on In-vitro Digestibility and Rumen Fermentation Characteristic of Ammoniated Oil Palm Trunk. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 10(3), 1258-1262. <http://dx.doi.org/10.18517/ijaseit.10.3.11574>

- Barraso C, López-Parra MM, Rodríguez PL (2021). Effect of Grape Pomace Incorporation on Fermentative Characteristics of a Concentrate. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 10(1), 69-79. <http://dx.doi.org/10.15640/jaes.v10n1a9>
- Blummel M, Givens DI, Moss AR (2005). Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 379-390. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.06.001
- Cavaca LAS, López IM, Silvero G, Afonso CAM (2020). The olive-tree leaves as a source of high-added value molecules: Oleuropein. (Chp.5). In: *Studies in Natural Products Chemistry*, 64: 131-180. Ed. Atta-Ur-Rahman. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. ISBN: 978-0-12-817903-1
- Cone JW, Van Gelder AH (1999). Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 76(3-4), 251-264. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00222-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00222-3)
- Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process biochemistry*, 48(10), 1532-1552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- EC (2009) Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*, 26-02-2009.
- ECONOMETRICA (2015). Understanding the Changes to Global Warming Potential (GWP) Values. Disponible en: <http://ecometrica.com/assets/Understanding-the-Changes-to-GWPs.pdf>. (Consultado: enero 2022)
- El Shaer HM, Omed HM, Chamberlain AG (1987). Use of faecal organisms from sheep for the *in vitro* determination of digestibility. *The Journal of Agricultural Science*, 109(2), 257-259. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080667>
- FEDNA (2015) Fundación Española Para el Desarrollo y la Nutrición Animal. disponible en: <http://www.fundacionfedna.org/node/468> (Consultado: febrero 2022)

- García AM, Moumen A, Ruiz D, Alcaide EM (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107(1-4), 61-74. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00066-X)
- Gerber PJJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G (2013). Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería. Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3437s.pdf>. (Consultado: mayo 2022).
- Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS, Becker K (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), 261-281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- INRA (2007). Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Necesidades de los animales – Valores de los alimentos. Tablas INRA 2007. ISBN 978-84-200-1138-7
- IPCC (2013). Glosario [Planton, S. (ed.)]. En: Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América
- Krishnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke K (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. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00734-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00734-5)
- Lee SJ, Kim HS, Eom JS, Choi YY, Jo SU, Chu GM, Lee Y, Seo J, Kim KH, Lee SS (2021). Effects of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves with Antioxidant and Antimicrobial Activities on In Vitro Ruminal Fermentation and Methane Emission. *Animals*, 11, 2008. <https://doi.org/10.3390/ani11072008>

- MAPA (2021). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceite.aspx>. (Consultado: febrero 2022)
- Martin AI, Molina E (2008). Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 142, 317-329. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.005
- McSweeney CS, Palmer B, Bunch R, Krause D (1999). Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the annin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 3075-3083. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3075-3083.1999>
- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83-93. doi:10.1016/S0377-8401(01)00232-2.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979). The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminants feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 93(1): 217-222. doi.org/10.1017/S0021859600086305.
- Menke KH, Steingass H (1988). Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- MITECO (2022). Inventario Nacional de Emisiones a la Atmósfera. Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. Serie 1990-2012. Informe resumen marzo 2022. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/resumen_inventario_gei-ed_2022_tcm30-534394.pdf. (Consultado: mayo 2022).

- Molina E, Yáñez DR, Moumen A, Martín AI (2003). Ruminal degradability and *in vitro* intestinal digestibility of sunflower meal and *in vitro* digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal Comparison between goats and sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 110, 3–15. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.08.002
- Montiel MD (2013). Influencia de los tratamientos con polietilenglicol o urea, textura del endosperma y estado fenológico sobre el grano de sorgo (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce. Universidad Nacional de Mar del Plata). Disponible en: https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/6328/INTA_CR%20BsAs_EEABalcarce_Montiel_MD_Influencia_tratamiento_polietilenglicol_urea.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (Consultado: mayo 2022).
- Mordenti AL, Giaretta E, Campidonico L, Parazza P, Formigoni A (2021). A Review Regarding the Use of Molasses in Animal Nutrition. *Animals*, 11, 115. <https://doi.org/10.3390/ani11010115>
- Navarro A, O'Brien M, López S, Boland TM, O'Kiely P (2011). Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 163-174. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.064
- Owens FN, Zinn R (1988). Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. 255-282 pp. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Patra AK, Saxena J (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12): 1198-1222. doi:10.1016/j.phytochem.2010.05.010.
- Phesatcha K, Wanapat M (2016). Mejoramiento del valor nutritivo y fermentación ruminal *in vitro* del ensilaje de leucaena mediante la suplementación con melaza y urea. *Revista asiática-australasiática de ciencias animales*, 29 (8), 1136–1144. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0591>

- Ramin M, Lerose D, Tagliapietra F, Huhtanen P (2015). Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated in vitro gas production system. *Livestock Science*, 181: 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.025>
- Rodríguez N, Araujo-Febres O, González B, Vergara-López J (2002). Efecto de la amonificación con urea sobre los componentes estructurales de la pared celular de heno de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick a diferentes edades de corte. *Archivos Latinoamericanos Producción Animal*, 10, 7-13. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14932/14909>. (Consultado: mayo 2022).
- Rojas-Downing MM, Nejadhashemi PA, Harrigan T, Woznicki SA (2017). Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Climate Risk Management*, 16, 145-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>
- Russell RW, Lolley JR (1989). Deactivation of tannin in high tannin milo by treatment with urea. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2427-2430. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79377-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79377-2)
- Salem AZM, Zhou C, Tan Z, Mellado M, Salazar MC, Elghandopur MMY, Odongo NE (2013). *In vitro* ruminal gas production kinetics of four fodder trees ensiled with or without molasses and urea. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(7): 1234-1242. [doi:10.1016/S2095-3119\(13\)60438-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60438-4)
- Schiere JB, Nell AJ, Ibrahim MNM (1988). Feeding of urea-ammonia treated rice straw. *World Animal Review*, 65, 31-42. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Johannes-Schiere/publication/39002604_Sri_Lanka_feeding_of_urea-ammonia_treated_rice_straw/links/5827422408ae254c50831a5b/Sri-Lanka-feeding-of-urea-ammonia-treated-rice-straw.pdf. (Consultado: mayo 2022).
- Shakeri P, Durmic Z, Vadhanabhuti J, Vercoe PE (2016). Products derived from olive leaves and fruits can alter in vitro ruminal fermentation and methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1367-1372. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7876>

- Slanac A (2019). Degradabilidad ruminal de la materia seca de heno de *Chloris gayana* tratado con urea en bovinos. Compendio de ciencias Veterinarias, 9(2), 18-23. doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2019.09.02.18-23
- Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ (2000). Oleuropein and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7), 1013-1023. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1013::AID-JSFA571%3E3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1013::AID-JSFA571%3E3.0.CO;2-C)
- Spanghero M, Chiaravalli M, Colombini S, Fabro C, Froidi F, Mason F, Moschini M, Sarnataro C, Schiavon S, Tabliaprieta F (2019). Rumen inoculum collected from cows at slaughter or from a continuous fermenter and preserved in warm, refrigerated, chilled or freeze-dried environments for in vitro tests. Animals, 9: 815. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fani9100815>
- Van Kessel JAS, Russel JB (1996). The effect of pH in ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology, 20(4): 205-210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00319.x>
- Wang J, Chen L, Yuan X, Guo G, Li J, Bai Y, Shao T (2017). Effects of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage prepared with rice straw, local vegetable by-products and alfalfa in Southeast China. Journal of Integrative Agriculture, 16(3): 664-670. [https://doi-org/10.1016/S2095-3119\(16\)61473-9](https://doi-org/10.1016/S2095-3119(16)61473-9)
- Wrathall JHM, Owen E, Pike DJ (1989). Upgrading barley straw for goats: the effectiveness of a sodium hydroxide and urea dip method. Animal Feed Science and Technology, 24(1-2), 57-67. <https://doi.org/10.1017/S0308229600017189>.
- Zhang X, Wang M, Wang R, Ma Z, Long D, Mao H, Wen J, Bernard LA, Beauchemin KA, Tan Z (2018). Urea plus nitrate pretreatment of rice and wheat straws enhances degradation and reduces methane production in *in vitro* ruminal culture. Journal of Science and Food Agriculture, 98: 5205-5211. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9056>

Capítulo IV

*Efecto del nivel de incorporación de
maíz sobre la degradabilidad de un
concentrado in vitro*

En proceso de revisión

Efecto del nivel de incorporación de maíz sobre la degradabilidad de un concentrado *in vitro*

Barraso C^{1,*}, Cobos S², López-Parra MM¹, Rodríguez J², García A³ y Rodríguez PL².

¹Departamento de Calidad de Carne, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de las Ciencias s/n, 10003, Cáceres, España.

³Departamento de Producción Animal, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), 06187, Badajoz, España.

*Autor para correspondencia: carmen.barraso@juntaex.es

Resumen: los rumiantes, debido a las características fermentativas que presenta su sistema digestivo, generan y emiten metano a la atmósfera, un potente gas de efecto invernadero, que contribuye de manera activa al calentamiento global del planeta. Debido a la importancia que tiene la ganadería en nuestro país, es necesario plantear estrategias que permitan reducir dichas emisiones. Una de ellas, es la utilización de almidones vítreos en la formulación de dietas de rumiantes, ya que su menor degradabilidad ruminal, da lugar a una disminución de la producción de metano. El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento fermentativo de un sistema de mezclas cebada/maíz, así como, de un concentrado comercial de cebo de terneros con diferentes niveles de maíz. Para ello, se llevó a cabo un análisis *in vitro* de la producción de gas y metano. Las mezclas de cebada/maíz se fermentaron durante un periodo de 18h, mientras que los concentrados se fermentaron durante 18 y 96h. Para las mezclas cebada/maíz, la menor producción de gas correspondió al 100% de maíz (207,97ml/g), aumentando la producción de metano en 0,11ml metano/g por cada punto porcentual de cebada añadido. En los concentrados, tras la fermentación de 18h, la menor producción de gas se asoció al concentrado control (165,47ml/g), mientras que el concentrado con mayor nivel de maíz obtuvo una menor producción de metano (15,76ml metano/g). Tras 96h de fermentación, la mayor producción de gas y metano (369,82ml/g y 161,22ml/g respectivamente) correspondió al

concentrado con mayor nivel de maíz. La inclusión de maíz en la formulación de concentrados de terneros limita la producción de metano *in vitro*.

Palabras claves: maíz, concentrado, producción de gas, metano.

Abstrac: ruminants are a major source of greenhouse gas emissions because of their fermentative digestive system produces certain end products such as methane. Livestock plays a crucial economic role in Spain. It therefore seems necessary to develop strategies to reduce these emissions. One of them is the use of glassy starches in ruminants feed, as their low degradability in the rumen leads to a decrease in methane production. The study aimed to evaluate the effects on ruminal fermentation of different levels of inclusion of corn starch in a barley/corn mixture system, as well as a commercial calf feedstuff based on *in vitro* analysis of gas and methane production. The barley/corn mixtures were fermented for 18h, while the feedstuffs were fermented for 18 and 96h. For the barley/corn mixtures, the lowest gas production level was observed in the 100% corn (207,97ml/g), increasing methane production by 0,11ml methane/g for each percentage point of barley added. In the feedstuff, after 18h fermentation, the lowest level of gas production was obtained in the control one (165,47ml/g), while the feedstuff with a higher starch level led to the lower methane production (15,76ml methane/g). After 96h of fermentation, the highest gas and methane production level (369,82ml/g and 161,22ml methane/g respectively) corresponded to the lowest starch level. The inclusion of corn in the calf feedstuff formulation limits on methane production *in vitro*.

Key Word: starch, gas production, methane.

1.-Introducción

La producción ganadera desempeña un papel fundamental en la economía de las zonas rurales, sus actividades ligadas a la tierra contribuyen al asentamiento de la población, además de jugar un papel fundamental en los sistemas alimentarios, aportando productos ricos en proteínas, vitaminas y minerales de alta calidad (López-Pedrouso *et al.*, 2020). Sin embargo, la producción ganadera tiene el efecto negativo de contribuir activamente al cambio climático al emitir gases de efecto invernadero (GEI) a lo largo de

su ciclo productivo. El principal GEI asociado a la producción ganadera y más concreto a los rumiantes es el metano (CH_4), cuyo origen radica en la fermentación ruminal y supone el 68,39% de las emisiones de CH_4 del sector primario en España (MITECO, 2022).

Las acciones para mitigar las emisiones de GEI procedentes del sector ganadero han adquirido una vital importancia, ya que el cambio climático es una amenaza real con múltiples repercusiones, que pone en peligro la producción agroganadera.

Uno de los posibles planteamientos que se reporta desde el campo de la nutrición animal es la utilización de concentrados amiláceos de degradación lenta, formulados a partir de cereales como el maíz, caracterizado por presentar un endospermo córneo y gránulos de almidón de gran tamaño, envueltos en una matriz proteica continua y densa (Xu *et al.*, 2019). Esta estructura compacta dificulta el ataque microbiano de las partículas de almidón, escapando del rumen sin ser totalmente fermentados, reduciendo por tanto la producción de gas y CH_4 ruminal, al mismo tiempo que permite que parte del almidón se digiera en el intestino directamente en forma de glucosa (McLeod *et al.*, 2006).

Por tanto, el aumento de la presencia de almidones de maíz en la formulación de concentrados de cebo podría ser una posible estrategia para la mitigar la producción de CH_4 en rumiantes de cebo. Sin embargo, esta sugerencia choca, en alguna medida, con las recomendaciones y uso de materias primas habitualmente utilizadas como referencia. Así, las normas FEDNA (2019) establecen un nivel máximo de 40% de grano de maíz en fórmulas de concentrados para terneros y corderos, junto a un máximo de 45% de almidón (FEDNA, 2008).

Por lo tanto, resulta interesante abordar en qué medida la cantidad de maíz y su almidón repercuten sobre la producción de gas y CH_4 en una fermentación. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto que ejerce la inclusión de diferentes porcentajes de maíz sobre la cinética de producción de gases y la producción de CH_4 *in vitro* en un sistema de mezclas cebada/maíz, así como, en un concentrado de cebo de terneros con diferentes niveles de incorporación de maíz, para determinar si la mayor presencia de maíz altera el comportamiento fermentativo y/o ejerce algún efecto sobre la producción de CH_4 .

2.-Material y métodos

Para la elaboración de este estudio se diseñaron dos tipos de ensayos:

El primero, basado en el estudio de un sistema de mezclas cebada/maíz en diferentes proporciones (cebada/maíz): 100/0; 75/25; 50/50; 25/75 y 0/100. La elaboración de las mezclas se llevó a cabo con una amasadora doméstica, tras haber realizado pruebas previas para determinar el tiempo óptimo de mezcla.

El segundo, en el cual se incluyó maíz a un concentrado de cebo de terneros hasta alcanzar diferentes proporciones, 41% (C5), 43% (C10) y 44,85% (C15), que suponen, respectivamente un 5%, 10% y 15% sobre el nivel de maíz del concentrado de referencia, superando las recomendaciones FEDNA (2019) para terneros de cebo.

Análisis químico de los concentrados experimentales

Las muestras se analizaron siguiendo el Reglamento CE 152/2009 (EC, 2009), para cenizas, materia orgánica (M.O), grasa bruta (G.B), proteína bruta (P.B), fibra bruta (F.B), fibra neutro detergente (F.N.D) y fibra ácido detergente (F.A.D).

Proceso de fermentación in vitro: producción de gas

Para llevar a cabo el proceso de fermentación *in vitro* se siguió el protocolo propuesto por Menke *et al.* (1979), para ello, se utilizaron jeringas de vidrio de 120ml de capacidad con punta tipo Luer, a las que se incorporó una válvula de tres vías, que permitió conseguir un cierre hermético de la jeringa y acoplar diferentes dispositivos de medida.

Como fuente de inóculo se utilizaron heces frescas de ovino (El Shaer *et al.*, 1987), con el fin de asegurar el bienestar de los animales (Spanghero *et al.*, 2019), ya que ha sido demostrado que presenta una alta correlación al compararlas con el uso de líquido ruminal (Ramin *et al.*, 2015).

Las heces fueron extraídas directamente del recto del animal y justo antes de la puesta a punto del proceso de fermentación.

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Fabricación de saliva artificial a partir de cuatro soluciones (Aghajanzadeh *et al.*, 2015): solución macromineral, solución tampón, solución reductora y solución micromineral.
- Elaboración de líquido fecal, mezclando homogéneamente 600ml de saliva artificial con 100g de heces frescas.

Primer ensayo (mezclas cebada/maíz)

En el primer ensayo se emplearon dos gradillas de 12 jeringas (4 jeringas/fila) con un total de 24 jeringas, dispuestas de tal modo que, en cada gradilla, 2 jeringas actúan como blanco (sólo 30ml de líquido fecal), otras 2 actúan de testigo (0,2g de cebada como sustrato fermentador de referencia). Las 4 filas de jeringas restantes contienen como sustrato fermentador 0,2g de mezclas de estudio, con 4 jeringas por cada mezcla elaborada, siempre en condiciones equivalentes.

Las muestras fueron incubadas a 39°C durante un periodo de 18h, ya que, este periodo se considera suficiente para determinar el potencial de degradación de un concentrado (Damiran and Yu, 2010). Transcurrido este tiempo, se midió el desplazamiento del émbolo producido por el gas de fermentación.

Segundo ensayo (inclusión de maíz en concentrado de cebo)

Se siguió el mismo diseño experimental que en el primer ensayo, de tal modo que, en cada gradilla 2 jeringas actúan como blancos (sólo 30ml de líquido fecal), otras 2 actúan como testigo (0,2g de cebada como sustrato fermentador de referencia) y 4 jeringas para cada concentrado de estudio (control, C5, C10 y C15). Inicialmente, las mismas muestras se sometieron a un periodo de fermentación de 96h, anotando el avance del émbolo a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, con el fin de estudiar la cinética de producción de gases (El-Meadaway *et al.*, 1998). Posteriormente, se hizo una réplica de la prueba durante un periodo fermentativo de 18h, para igualar el tiempo al de las mezclas cebada/maíz.

Medida de la producción final de CH₄

La medida de la producción de CH₄ se realizó al terminar la prueba de fermentación (tras 18h en el primer ensayo y tras 18h y 96h en el segundo ensayo) mediante un detector de gases GMI PS200, que determina el porcentaje de CH₄ en el gas producido. Para su medición, se utilizó un sistema de circuito cerrado de gases, donde condujimos a un bote Duran de 500ml el gas generado en el interior de las jeringas. La concentración final se expresó como ml de CH₄/g de material fermentado.

Globalmente, el diseño experimental trata de detectar los efectos del sustrato sobre la producción total de gas y de CH₄ mediante un método sencillo y reproducible en condiciones de laboratorio.

Análisis estadístico

Las distintas variables se describieron mediante su media y desviación típica. Las posibles diferencias causadas por la proporción de cebada/maíz, o por el porcentaje de maíz incorporado al concentrado, se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, equivalente a un análisis de la varianza, debido a que la variable porcentaje de CH₄ no sigue una distribución normal. En el caso de que las diferencias resultaran estadísticamente significativas ($p < 0,05$), los grupos independientes se establecieron mediante una prueba de Dunn (Dinno, 2015).

La relación lineal entre variables se calculó mediante una ecuación de regresión, valorando el ajuste mediante el coeficiente de correlación lineal **r**.

Para ello, se utilizó el programa estadístico SPSS V22.

3.-Resultados

Primer ensayo

En el primer ensayo se analizaron las mezclas cebada/maíz (100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100). Los resultados obtenidos para la composición química (**Tabla IV. 1**), son consistentes con los porcentajes de cebada/maíz incorporados.

Tabla IV. 1.- Análisis químico de las mezclas cebada/maíz (media \pm desviación típica) expresado en materia seca.

C/M	M.O	G.B	P.B	F.B	F.N.D	F.A.D
100/0	97,47 \pm 0,52	2,45 \pm 0,08	11,65 \pm 0,12	3,73 \pm 0,40	41,32 \pm 1,14	6,14 \pm 0,52
75/25	97,85 \pm 0,08	3,09 \pm 0,01	10,05 \pm 0,10	3,13 \pm 0,61	37,68 \pm 1,40	5,48 \pm 0,76
50/50	97,92 \pm 0,17	3,24 \pm 0,91	9,70 \pm 0,17	2,73 \pm 0,34	33,07 \pm 2,13	4,84 \pm 0,87
25/75	97,85 \pm 0,03	3,33 \pm 0,04	9,05 \pm 0,17	2,20 \pm 0,38	28,98 \pm 1,90	4,31 \pm 1,35
0/100	97,47 \pm 0,52	4,35 \pm 0,18	8,15 \pm 0,53	1,26 \pm 0,23	25,13 \pm 2,73	6,69 \pm 0,86

C/M, porcentaje de cebada/maíz en la mezcla; M.O, Materia Orgánica; G.B, Grasa Bruta; P.B, Proteína Bruta; F.B, Fibra Bruta; F.N.D, Fibra Neutro Detergente; F.A.D, Fibra Ácido Detergente.

En la **Tabla IV. 2** se recogen los resultados referentes al proceso de fermentación *in vitro*. La mayor producción de gas ($p < 0,001$) se asocia a los mayores porcentajes de cebada en la mezcla, en tanto que la menor se corresponde con el 100% de maíz, encontrándose el resto de las mezclas de estudio en posiciones intermedias.

Referente a la producción de CH₄ (**Tabla IV. 2**), se observa un comportamiento paralelo al de la producción de gas, de manera que un incremento del maíz en la mezcla se acompaña de un descenso significativo en su producción, comprobándose que la incorporación de un 75% de maíz o más en la mezcla, determina una disminución significativa de la producción de CH₄ ($p < 0,05$), frente a niveles de maíz inferiores al 25%.

En nuestro caso, la respuesta de producción de CH₄ sigue una tendencia lineal en función de la incorporación de cebada a la mezcla, lo que permite su modelización

(Figura IV. 1) con un ajuste de $r = 0,97$. Estos resultados determinan que en un sistema de mezcla de cebada/maíz, la mínima producción de CH_4 se alcanza con el 0% de cebada, elevándose en 0,11ml/g de sustrato de fermentado por cada punto porcentual de cebada añadido en la mezcla.

Tabla IV. 2.- Producción de gas y CH_4 de las mezclas cebada/maíz tras 18h de incubación (media \pm desviación típica).

<i>C/M</i>	P.G	CH₄
100/0	260,37c \pm 8,60	31,24a \pm 1,03
75/25	258,06c \pm 7,80	30,33a \pm 1,72
50/50	252,49bc \pm 4,36	27,16ab \pm 1,60
25/75	236,86ab \pm 7,78	24,84b \pm 0,71
0/100	207,97a \pm 6,27	19,79b \pm 1,70
<i>p</i>	0,0001	0,02

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias (test de Dunn, $p < 0,05$). *C/M*, porcentaje de cebada/maíz en la mezcla; *p*, p-valor; P.G, producción de gas expresado en ml/g de sustrato fermentado; CH_4 , producción de metano expresado en ml CH_4 /g de sustrato fermentado.

Igualmente, si analizamos la producción de CH_4 en función del gas generado (Figura IV. 2), podemos observar que, en el rango de 210 a 260ml de gas producido, el CH_4 aumenta 0,21ml/g por cada nuevo ml de gas originado.

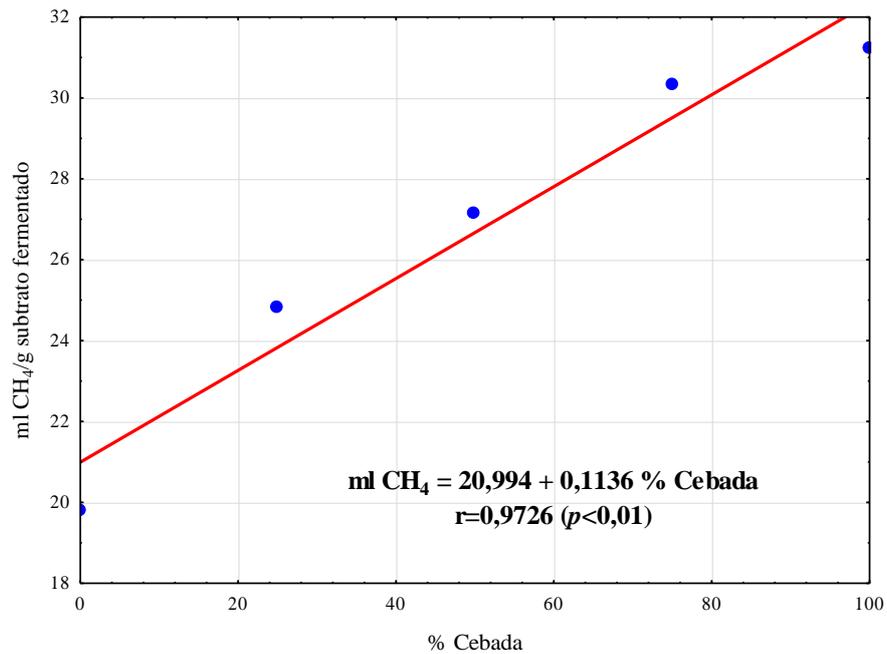


Figura IV. 1.- Producción de CH₄ (ml/g de sustrato fermentado) en función del % de cebada incorporado en la mezcla de cebada/maíz.

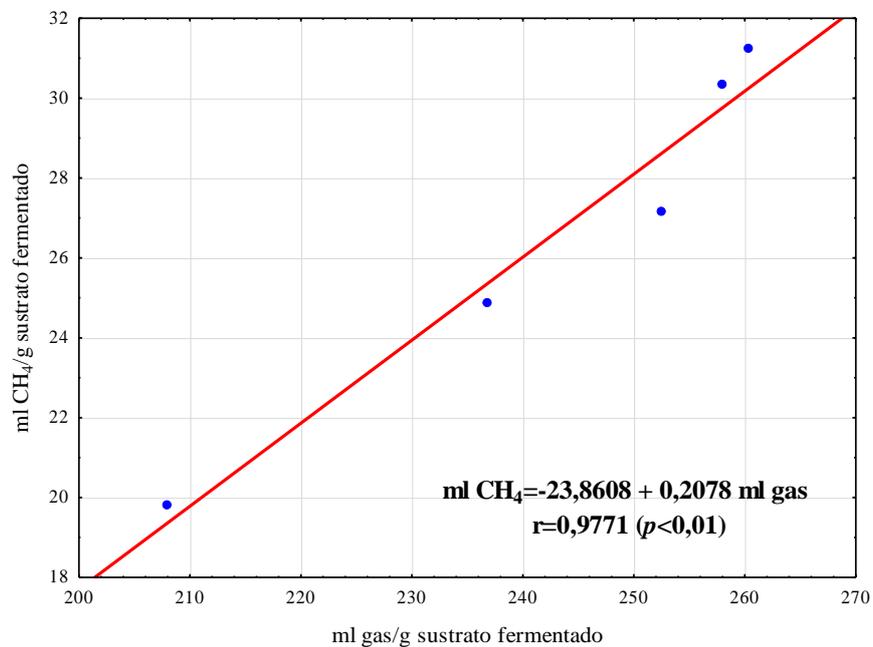


Figura IV. 2.- Producción de CH₄ (ml/g de sustrato fermentado) en función de los ml de gas producidos en un sistema de mezcla cebada/maíz.

Segundo ensayo

En el segundo ensayo, se estudió el efecto de la incorporación de maíz en distintas proporciones a un concentrado comercial de cebo de terneros, obteniendo así tres concentrados experimentales (C5, C10 y C15) cuya composición química se indica en la **Tabla IV. 3.**

Tabla IV. 3.- Análisis químico de los concentrados experimentales (media \pm desviación típica)

	M.O	G.B	P.B	F.B	F.N.D	F.A.D
Cn	95,87 \pm 0,79	5,18 \pm 0,31	12,99 \pm 0,63	8,21 \pm 0,76	40,36 \pm 3,71	10,48 \pm 0,73
C	97,47 \pm 0,52	2,45 \pm 0,08	11,65 \pm 0,12	3,73 \pm 0,40	41,32 \pm 1,14	6,14 \pm 0,52
M	97,47 \pm 0,52	4,35 \pm 0,18	8,15 \pm 0,53	1,26 \pm 0,23	25,13 \pm 2,73	6,69 \pm 0,86
C5	96,55 \pm 0,44	5,03 \pm 0,47	12,93 \pm 0,04	8,19 \pm 0,73	40,27 \pm 1,22	10,30 \pm 0,11
C10	96,75 \pm 0,62	4,98 \pm 0,18	12,63 \pm 0,11	8,15 \pm 0,72	40,20 \pm 0,76	10,27 \pm 0,76
C15	97,83 \pm 0,07	4,95 \pm 0,53	14,57 \pm 0,16	8,12 \pm 1,45	40,18 \pm 0,48	10,24 \pm 0,61

M.O, Materia Orgánica; G.B, Grasa Bruta; P.B, Proteína Bruta; F.B, Fibra Bruta; F.N.D, Fibra Neutro Detergente; F.A.D, Fibra Ácido Detergente; Cn, concentrado control; C, cebada; M, maíz; C5, concentrado con un 41% de maíz; C10, concentrado con un 43% de maíz; C15, concentrado con un 44,85% de maíz.

En cuanto a la cinética de producción de gases en el ensayo de fermentación larga (**Figura IV. 3** y **Tabla IV. 4**), encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la producción de gas, excepto a las 8h.

Tomando la cebada como referencia, observamos que al inicio de la fermentación, es el sustrato que menor gas produce. A las 6h, presenta valores intermedios entre C10 y el concentrado control. Es a partir de las 10h cuando la producción de gas es notablemente superior al resto de concentrados, hasta las 48h, donde el C15 presenta valores semejantes incluso superiores hasta el final del proceso de fermentación. El análisis de estos resultados resulta complejo, pero se podrían definir dos fases (**Figura IV. 3**), una inicial hasta las primeras 12h, donde se aprecia una menor producción de gas en el concentrado

C10, que, en función de los resultados del primer ensayo (**Figura IV. 2**) debería corresponder con una menor producción de CH_4 debido a la correlación encontrada entre ambos parámetros. Y otra fase posterior, a partir de las 12h en que C15 produce más gas que el resto de concentrados, igualando a la cebada, a pesar de tener la mayor proporción de maíz.

En cuanto a la producción de CH_4 obtenida al final del periodo de fermentación (**Tabla IV. 4**), se pueden observar dos grupos claramente diferenciados. Por un lado, la cebada y el concentrado C15, y, por otro, el resto de los concentrados del estudio, no ajustándose al comportamiento planteado en la hipótesis de partida, ya que el concentrado con mayor porcentaje de maíz (C15) es el que más CH_4 produce.

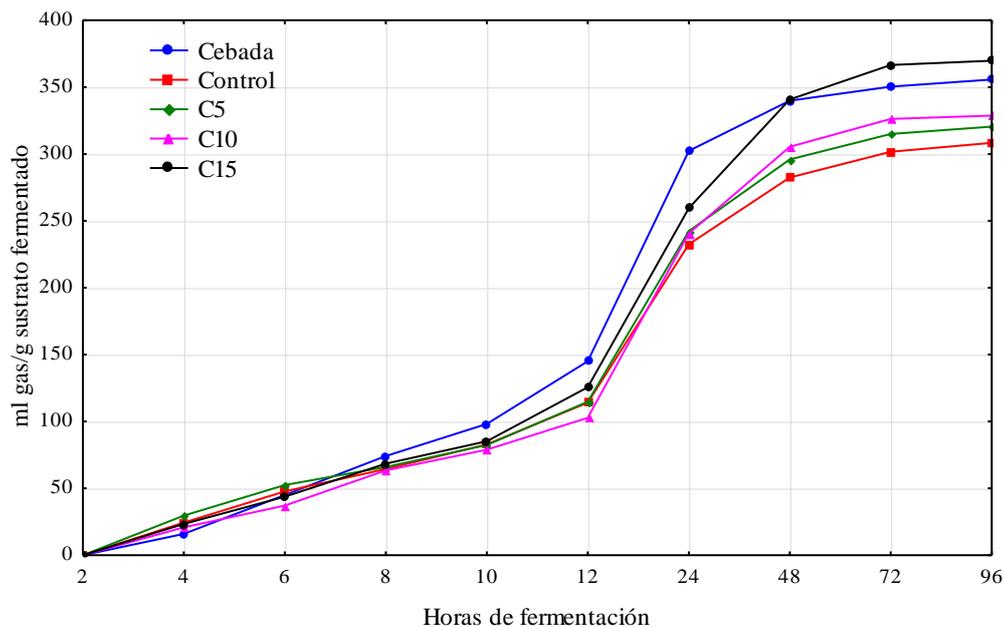


Figura IV. 3.- Cinética de producción de gases de los diferentes concentrados experimentales (ml/g sustrato fermentado).

Tabla IV. 4.- Producción de gas y CH₄ tras un periodo de fermentación de 96h.

		Cebada	Control	C5	C10	C15	<i>p</i>
P.G 4h	<i>Media</i>	15,86a	24,40b	29,61b	20,80ab	23,42ab	0,001
	<i>d.t</i>	5,84	0,76	6,81	4,98	3,54	
P.G 6h	<i>Media</i>	45,05ab	47,74b	54,46b	37,14a	43,81ab	0,0001
	<i>d.t</i>	4,00	1,32	9,24	5,15	1,53	
P.G 8h	<i>Media</i>	74,18	64,42	65,97	63,43	68,43	n.s
	<i>d.t</i>	7,87	5,54	6,22	7,26	5,03	
P.G 10h	<i>Media</i>	98,20b	82,83a	82,41a	78,93a	85,23a	0,001
	<i>d,t</i>	4,94	5,80	7,23	9,76	1,15	
P.G 12h	<i>Media</i>	145,07c	114,14ab	114,75ab	102,77a	125,56b	0,0001
	<i>d.t</i>	6,49	8,15	7,44	19,43	2,12	
P.G 24h	<i>Media</i>	302,42c	232,54a	242,35ab	240,71ab	259,53bc	0,0001
	<i>d.t</i>	8,55	13,12	4,40	16,79	3,14	
P.G 48h	<i>Media</i>	339,87b	282,42a	295,87a	305,41ab	340,78b	0,0001
	<i>d.t</i>	13,75	13,33	8,58	11,09	10,28	
P.G 72h	<i>Media</i>	350,39bc	301,70a	315,00a	326,33ab	366,56c	0,0001
	<i>d.t</i>	13,34	14,91	9,01	12,71	13,08	
P.G 96h	<i>Media</i>	355,75bc	308,33a	320,47a	328,73ab	369,82c	0,0001
	<i>d.t</i>	11,50	14,96	8,16	12,75	13,17	
CH₄-96h	<i>Media</i>	159,05b	128,26a	129,90a	130,53a	161,22b	0,001
	<i>d.t</i>	17,48	5,53	5,43	9,29	10,02	

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias (test de Dunn, $p < 0,05$). C5, concentrado con un 41% de maíz; C10, concentrado con un 43% de maíz; C15, concentrado con un 44,85% de maíz; *p*, p-valor; P.G, producción de gas expresado en ml/g de sustrato fermentado; d.t, desviación típica; CH₄, producción de metano expresado en mlCH₄/g de sustrato fermentado.

Tras los resultados obtenidos en la cinética de fermentación de los concentrados, y con el fin de hacer una comparación directa con el primer ensayo, se optó por realizar una fermentación a 18h en condiciones similares. Estos datos se recopilan en la **Tabla IV. 5**, donde, podemos observar un mayor nivel de producción de gas ($p<0,01$) asociado a la cebada, frente al concentrado control, posicionándose C5, C10 y C15 en niveles intermedios. Comparando estos resultados con los obtenidos en el primer ensayo (**Tabla IV. 2**), cabría esperar que la menor producción de gas se asociara al C15, sin embargo, es el concentrado control el que presenta menor producción de gas.

Respecto a la producción de CH₄ (**Tabla IV. 5**), encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre las muestras de estudio, en este caso, el comportamiento es similar en ambos ensayos, donde el aumento de la concentración de maíz en la muestra, disminuye significativamente la producción de CH₄, siendo el C15 el menos metanogénico.

Tabla IV. 5.- Producción de gas y CH₄ tras un periodo de fermentación de 18h (media \pm desviación típica).

	P.G	CH₄
Cn	165,47a \pm 8,76	17,39ab \pm 2,53
C	210,83b \pm 5,74	21,64b \pm 2,53
C5	170,85ab \pm 5,35	17,09ab \pm 1,00
C10	182,46ab \pm 4,44	15,94ab \pm 1,18
C15	170,57ab \pm 11,51	15,76a \pm 1,13
<i>p</i>	0,0001	0,04

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias (test de Dunn, $p<0,05$). P.G, producción de gas expresado en ml/g de sustrato fermentado; CH₄, producción de metano expresado en mlCH₄/g de sustrato fermentado; Cn, concentrado control; C, cebada; C5, concentrado con un 41% de maíz; C10, concentrado con un 43% de maíz; C15, concentrado con un 44,85% de maíz; *p*, p-valor.

4.-Discusión

Los resultados de la composición de los cereales utilizados en las mezclas cebada/maíz (**Tabla IV. 1**) están dentro del rango habitual de variación. Así un 11,65% de P.B para la cebada se sitúa en el centro del rango de variación (8-14%) indicado para esta especie (FEDNA, 2019). El maíz, por su parte está dentro del rango alto de P.B que se extiende del 6 al 9% (FEDNA, 2019). La F.B se correlaciona negativamente con la presencia de almidón (FEDNA, 2019), la cebada está dentro del rango bajo de variación (2,5-6%), en tanto que el maíz está, igualmente, en el rango bajo (1,3-2,6) de la variación habitual (FEDNA, 2019).

Los resultados de producción de gas obtenidos en el primer ensayo (**Tabla IV. 2**), avalan la hipótesis inicial de partida, ya que, a medida que la concentración de maíz aumenta en la muestra, la producción de gas disminuye. En concordancia con nuestros resultados, aunque utilizando técnicas de degradación enzimática *in vitro*, Herrera-Saldana *et al.* (1990) también obtuvieron una degradabilidad significativamente superior (28%) para el almidón de cebada, con respecto al de maíz. Asimismo, Opatpatanak *et al.* (1994) indicaron una producción de gas a las 7h un 60% mayor para la cebada que para el maíz. En un meta-análisis realizado por Offner *et al.* (2003), también observaron una mayor degradabilidad ruminal de la cebada en comparación con el maíz. En la misma línea, Restrepo *et al.* (2016) en un estudio de fermentación *in vitro* evaluaron cuatro suplementos comerciales con diferentes fuentes de energía y obtuvieron como resultado una menor producción de gas a las 24h en aquellos suplementos cuya principal fuente de energía la conformaba el maíz.

Por otro lado, Atasoglu y Yurtman (2007), utilizando la técnica de producción de gas *in vitro*, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes cereales analizados tras 12h de incubación. Resultados similares fueron encontrados por Chai *et al.* (2004), quienes no encontraron diferencias significativas en la producción de gas entre la cebada (260ml/g) y el maíz (246ml/g) tras 16h de incubación.

Paralelamente, si comparamos los resultados de producción de gas a las 18h en ambos ensayos (**Tabla IV. 2** y **Tabla IV. 5**), no se observa el mismo patrón de comportamiento, ya que, teóricamente, el C15 debería presentar una menor producción de gas al contener un mayor porcentaje de maíz, sin embargo, la menor producción se

corresponde con el concentrado control. Estas diferencias podrían deberse al contenido de almidón vítreo del maíz utilizado, ya que su concentración depende de la variedad de planta y del momento de la cosecha (Trinacty *et al.*, 2016), asociándose la degradabilidad del almidón al grado de vidriosidad de éste (Correa *et al.*, 2002). En cualquier caso, para los cereales, se acepta que la producción de gas es directamente proporcional al almidón disponible (Lanzas *et al.*, 2007).

En cuanto a la producción de CH₄ los resultados muestran patrones de comportamiento similares (**Tabla IV. 2** y **Tabla IV. 5**), confirmando de nuevo la hipótesis inicial. Aunque es difícil comparar nuestros resultados con otros, teniendo en cuenta la escasez de estudios y las variaciones en la metodología utilizada. Restrepo *et al.* (2016) en condiciones *in vitro*, encontraron una menor producción de CH₄ en la evaluación de diferentes fuentes de energía de la dieta para rumiantes, siendo la dieta que contenía maíz la menos metanogénica. Carro y Ranilla (2003) en condiciones *in vitro*, también encontraron una mayor concentración de CH₄ para la cebada (673 μmol) frente al maíz (646 μmol).

Por otro lado, Beauchemin y McGinn (2005) en ensayos *in vivo*, encontraron una reducción de la producción de CH₄ del 4,03% al 2,81% de la energía bruta ingerida al utilizar maíz en lugar de cebada como concentrado energético de terneros de cebo, sin embargo, López *et al.* (2011), obtuvieron valores significativamente mayores (+11,6%) en cabras alimentadas con maíz respecto a la cebada.

Estos resultados, aparentemente contradictorios con la tendencia general, pueden explicarse por un mejor acoplamiento de la tasa de fermentación de la cebada con la proteína, que aportaría menos hidrógeno libre en el rumen para generar CH₄. Paralelamente, el maíz, con una degradación más lenta, dejaría más partículas metanogénicas disponibles para los microorganismos ruminales, que, en el animal vivo, escaparían del rumen (Allen y Ying, 2021).

Hatew *et al.* (2015) en un estudio de fermentación *in vitro*, indican resultados con una tendencia inversa a la nuestra, ya que los concentrados con mayor proporción de almidón degradable producen menos gas y CH₄ a las 24h de fermentación.

En la **Tabla IV. 4** y **Figura IV. 3** se recogen los resultados de la cinética de producción de gas del segundo ensayo. Partiendo de la premisa que el tiempo máximo

esperable de un concentrado molido en el rumen es de 24h (Kramer *et al.*, 2013; Warner *et al.*, 2013), observamos que en nuestro estudio existe un cierto efecto inhibitor de la producción de gas cuando se incorpora maíz a la mezcla en comparación con la cebada de referencia.

En cuanto a los resultados obtenidos para la producción de CH₄ al final del proceso de fermentación (**Tabla IV. 4**), es difícil contrastarlos con los resultados de otros autores, ya que la mayoría de los trabajos incluyen tiempos de fermentación inferiores a 48h. Sólo Kim *et al.* (2013), encontraron que el maíz es más metanogénico que la cebada a las 72h de fermentación. Esta mayor producción de gas y CH₄ observada tras 96h en las muestras con mayor concentración de maíz podría ser indicativa de la mayor persistencia de almidón no degradado en tiempos superiores a 24h, quedando disponible un buen sustrato para ser fermentado por los microorganismos y, por tanto, producir mayor cantidad de gas y CH₄ (Opatpatanak *et al.*, 1994; Chai *et al.*, 2004).

5.-Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que existe una diferencia marcada entre el perfil fermentativo y metanogénico de la cebada y el maíz, presentando este último un menor potencial tanto fermentativo como metanogénico. Además, la inclusión de maíz en la formulación de concentrado de cebo de terneros se traduce en una menor producción de metano *in vitro* tras 18h de incubación, disminuyendo los niveles a medida que aumentan la concentración de maíz en el concentrado, así como, una respuesta positiva hasta las 12h de fermentación disminuyendo la producción de gas al aumentar el porcentaje de maíz en el concentrado.

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado dentro de las investigaciones que se están llevando a cabo en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la UEx y que están financiadas por el proyecto “Aplicación de tecnologías y datos de precisión para la mejora de la ganadería intensiva (TEGPI)”. Expediente AA-17-0084-2. Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura-FEDER y parcialmente por la beca INIA CPD2016-0037.

Agradecemos a M^a Jesús Guerrero, su inestimable colaboración en la realización de este trabajo en el laboratorio

Referencias bibliográficas

- Aghajanzadeh A, Maheri N, Salmat R, Ebrahimnezhad Y, Ghorbani A (2015). Developing a modified in vitro gas production technique to replace nylon bag method of evaluating protein degradation of alfalfa hay in ruminants. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(2), 339-345. Disponible en: http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_513320_ea5c5170bab82dbce79f13399e6fbf36.pdf. (Consultado: mayo 2022).
- Allen MS, Ying Y (2021). Effects of corn grain endosperm type and conservation method on site of digestion, ruminal digestion kinetics, and flow of nitrogen fractions to the duodenum in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 7617-7629. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18882>
- Atasoglu C, Yurtman IY (2007). In vitro fermentation of different starches by mixed micro-organisms from the sheep rumen. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91(9-10), 419-425. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00670.x>
- Beauchemin KA, McGinn SM (2005). Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science*, 83, 653-661. <https://doi.org/10.2527/2005.833653x>

- Carro MD, Ranilla MJ (2003). Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen microorganisms in vitro. *British Journal of Nutrition*, 90, 617-623. <https://doi.org/10.1079/BJN2003935>.
- Chai WZ, Van Gelder AH, Cone JW (2004). Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.11.014>.
- Correa CES, Shaver RD, Pereira MN, Lauer GJ, Kohn K (2002). Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, 85, 3008-3012. <https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302%2802%2974386-5>.
- Damiran D, Yu P (2010). Chemical profile, rumen degradation kinetics, and energy value of four hull-less barley cultivars: comparison of the zero-amylose waxy, waxy, high-amylose, and normal starch cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(19), 10553–10559. DOI:10.1021/jf101624a
- Dinno (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *The Stata Journal*, 15(1), 292-300. <https://doi.org/10.1177%2F1536867X1501500117>
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*, 26-02-2009. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0152&from=EN>. (Consultado: mayo 2022).
- El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ (1998). Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining in vitro digestibility and gas production. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 673-679. <https://doi.org/10.4141/A97-109>.
- El Shaer HM, Omed HM, Chamberlain AG (1987). Use of faecal organisms from sheep for the in vitro determination of digestibility. *Journal of Agriculture Science Cambridge*, 109, 257-259. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080667>.

- FEDNA (2008). Necesidades nutricionales para rumiantes de cebo. Normas FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/sites/default/files/NORMAS_RUMIANTES_2008.pdf. (Consultado: marzo 2022).
- FEDNA (2019). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 4ª ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Disponible en: <https://www.fundacionfedna.org/node/370>. (Consultado: marzo 2022).
- Hatew B, Cone JW, Pellikaan WF, Podesta SC, Bannik A, Hendriks WH, Dijkstra J (2015). Relationship between in vitro and in vivo methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 202, 20-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.012>.
- Herrera-Saldana RE, Huber JT, Poore MH (1990). Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *Journal of Dairy Science*, 73, 2386–2393. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78922-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78922-9).
- Kim SH, Mamuad LL, Jeong CD, Choi YJ, Lee SS, Ko JY, Lee SS (2013). In vitro evaluation of different feeds for their potential to generate methane and change methanogen diversity. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 26(12), 1698-1707. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13260>
- Kramer M, Lund P, Weisbjerg MR (2013). Rumen passage kinetics of forage- and concentrate-derived fiber in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96: 3163-3176. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6146>.
- Lanzas C, Fox DG, Pell AN (2007). Digestion kinetics of dried cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 136(3-4), 265-280. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.004>
- López MC, Ródenas L, Piquer O, Cerisuelo A, Cervera C, Fernández C (2011). Determinación de producción de CH₄ en caprinos alimentados con dietas con distintos cereales. *Archivos de Zootecnia*, 60 (232), 943-951. <http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000400011>.

- López-Pedrouso M, Rodríguez-Vázquez R, Purriños L, Oliván M, García-Torres S, Sentandreu MA, Lorenzo JM, Zapata C, Franco D (2020). Sensory and Physicochemical Analysis of Meat from Bovine Breeds in Different Livestock Production Systems, Pre-Slaughter Handling Conditions and Ageing Time. *Foods*, 9(176) doi:10.3390/foods9020176
- McLeod KR, Baldwin RL, El-Kadi SW, Harmon DL (2006). Site of starch digestion: impact on energetic efficiency and glucose metabolism in beef and dairy cattle. In: *Cattle Grain Processing Symposium*, Oklahoma State University, pp. 129-136. Disponible en: <https://sweetbran.com/storage/1kv8m7Ib2qT1m53C9w13q226bQnwEHRN6c5lxqAC.pdf>. (Consultado: mayo 2022).
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979). The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminants feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 93(1), 217-222. doi.org/10.1017/S0021859600086305.
- MITECO (2022). Informe de Inventario Nacional Gases de Efecto Invernadero. Edición 2022 (1990-2020). Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico. Madrid. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/es_nir_edicion2022_tcm30-523942.pdf. (Consultado: mayo 2022).
- Offner A, Bach A, Sauvant D (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 81-93. [doi:10.1016/S0377-8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5).
- Opatpatanak Y, Kellaway RC, Lean IJ, Annison G, Kirby A (1994.) Microbial Fermentation of Cereal Grains in Vitro. *Australian Journal of Agricultural and Research*, 45, 1247-1263. <https://doi.org/10.1071/AR9941247>.
- Ramin M, Lerosé D, Tagliapietra F, Huhtanen P (2015). Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated in vitro gas production system. *Livestock Science*, 181, 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.025>

- Restrepo C, Noguera RR, Posada SL (2016). Efecto de la sustitución energética del maíz (*Zea mays*) en dietas para rumiantes sobre la producción de metano in vitro. *Livestock Research for Rural Development* 28(10). Disponible en: https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/13639/1/RestrepoCatalina_2016_%20EfectoSustitucionEnergeticaMaiz.pdf. (Consultado: mayo 2022).
- Spanghero M, Chiaravalli M, Colombini S, Fabro C, Frolidi F, Mason F, Moschini M, Sarnataro C, Schiavon S, Tabliaprieta F (2019). Rumen inoculum collected from cows at slaughter or from a continuous fermenter and preserved in warm, refrigerated, chilled or freeze-dried environments for in vitro tests. *Animals*, 9, 815. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fani9100815>
- Trinacty J, Nedelnik J, Lang J, Loucka R, Kucera J (2016). Effect of maize kernel endosperm type and maturity stage on ruminal in situ degradability and post-ruminal *in vitro* dry matter and starch digestibility. *Czech Journal of Animal Science*, 61(8), 351–359. [Doi: 10.17221/62/2015-CJAS](https://doi.org/10.17221/62/2015-CJAS).
- Warner D, Dijkstra J, Tamminga S, Pellikaan WF (2013). Passage kinetics of concentrates in dairy cows measured with carbon stable isotopes. *Animal*, 7(12), 1935-1943. [DOI: 10.1017/S1751731113001584](https://doi.org/10.1017/S1751731113001584).
- Xu A, Lin L, Guo K, Liu T, Yin Z, Wei C (2019). Physicochemical properties of starches from vitreous and flourey endosperms from the same maize kernels. *Food Chemistry*, 291, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.024>.

Conclusiones

6.- Conclusiones

A vista de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos que conforman la presente tesis doctoral, podemos concluir que:

- I.- Los orujos tintos presentan un potencial de inhibición de producción de gas y metano, *in vitro*, superior a la de los orujos blancos.
- II.- La incorporación de orujo de uva tinto (variedad *Tempranillo*) a un concentrado tipo (cebada) ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de gas y metano *in vitro*, obteniendo un mayor potencial inhibitor con una inclusión del 7,5% del subproducto.
- III.- La incorporación del subproducto hoja de olivo desecada a un concentrado tipo ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de gas y CH₄ *in vitro*, y, este efecto podría ser debido a las características intrínsecas del subproducto, así como a la concentración del subproducto en la mezcla, obteniendo los mejores resultados en concentraciones del 10%.La conservación del subproducto mediante ensilado incorporando un 2% de urea y un 2% de melaza, mejora ligeramente el %DMO *in vitro* del subproducto, presentando un valor de EM similar al subproducto fresco. Referente a la producción de CH₄, se incrementa cuando el subproducto es conservado mediante ensilado y disminuye cuando es desecado.
- IV.- Existe una diferencia marcada entre el perfil fermentativo y metanogénico de la cebada y el maíz, presentando este último un menor potencial tanto fermentativo como metanogénico. Además, la inclusión de maíz en la formulación de concentrado de cebo de terneros se traduce en una menor producción de metano *in vitro* tras 18h de incubación, disminuyendo los niveles a medida que aumentan la concentración de maíz en el concentrado, así como, una respuesta positiva hasta las 12h de fermentación disminuyendo la producción de gas al aumentar el porcentaje de maíz en el concentrado.

Referencias bibliográficas

7.-Referencias bibliográficas

- Aghajanzadeh A, Maheri N, Salmat R, Ebrahimnezhad Y, Ghorbani A (2015). Developing a modified in vitro gas production technique to replace nylon bag method of evaluating protein degradation of alfalfa hay in ruminants. *Iranian Journal Of Applied Animal Science*, 5(2): 339-345.
- Aluwong T, Wuyep PA, Allam L (2011). Livestock-environment interactions: methane emissions from ruminants. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1265–1269. DOI: 10.5897/AJB10.1117
- ANKOM (2017). ANKOM RF gas production system. Operator's manual. Disponible en: <https://www.ankom.com/technical-support/rf-gas-production-system> (Consultado: enero 2022)
- Atikah IN, Alimon AR, Yaakub H, Abdullah N, Jahromi MF, Ivan M, Samsudin AA (2018). Profiling of rumen fermentation, microbial population and digestibility in goats fed with dietary oils containing different fatty acids. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1672-0>
- Attwood G, McSweeney C (2008). Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilisation in the rumen. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(1–2), 28–37. <https://doi.org/10.1071/EA07203>
- Aufrere J, Michalet-Dorea B (1988). Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 20(3), 203–218. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(88)90044-2)
- Ballesteros I, Oliva JM, Saez F, Ballesteros M (2001). Ethanol Production from Lignocellulosic Byproducts of Olive Oil Extraction. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 91(1), 237-252. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:237>
- Barragán BE, Téllez YA, Laguna A (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista de Sistemas Ambientales* 2(1), 44-50.
- Barry TN, McNabb WC (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 263–272. <https://doi.org/10.1017/s0007114599000501>
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, Beauchemin KA (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 209–228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaar C, Pomar C, Chiquette J (2001). Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(4), 563–574. <https://doi.org/10.4141/A00-119>
- Berbel J, Gutiérrez-Martín C, La Cal, JA (2018). Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva. *Mediterraneo Económico*, 31, 273–289. I.S.B.N-13:978-84-95531-89-6
- Bertran E, Sort X, Soliva M, Trillas I (2004). Composting winery waste: Sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 95(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.07.012>
- Blancquaert EH, Oberholster A, Ricardo-Da-Silva JM, Deloire AJ (2019). Effects of Abiotic Factors on Phenolic Compounds in the Grape Berry-A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40 (1).
- Blümmel M, Orskov ER (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2-3), 109-119. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90150-I](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90150-I)

- Blummel BYM, Gab HS, Becker K (1993). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77(6), 911–921. <https://doi.org/10.1079/BJN19970089>
- Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Massé D (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(3), 319–335. <https://doi.org/10.4141/A03-109>
- Borba A, Correia P, Fernandes J, Borba A (2001). Comparison of three sources of inocula for predicting apparent digestibility of ruminant feedstuffs. *Animal Research*, 50(4), 265–273. <https://doi.org/10.1051/animres:2001113>
- Broucek J (2018). Methane abatement strategies based on genetics and dietary manipulation of ruminants: a review. *Archivos de Zootecnia*, 67(259), 448–458.
- Bucchetti B, Matthews MA, Falginella L, Peterlunger E, Castellarin SD (2011). Effect of water deficit on Merlot grape tannins and anthocyanins across four seasons. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.003>
- Cabo CM, Rodríguez AB, Garrido A (2020). Valorización de subproductos de la agroindustria para una economía verde y circular. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura. I.S.B.N.: 978-84-09-26056-0. <https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/11732/1/978-84-09-26056-0.pdf>
- Callejo JA, Parra Heras T, Manrique T (2015). Evaluación de la producción y usos de los subproductos de las agroindustrias del olivar en Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo. Junta de Andalucía
- Carro MD, Ranilla MJ (2003). Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 90, 617–623. <https://doi.org/10.1079/BJN2003935>.
- Cattani M (2011). *In situ* and *in vitro* techniques for studying rumen fermentations: methodology and applications. Doctoral Thesis. Università degli Studi di Padova. Padova, Italia.
- Cersosimo LM, Wright ADG (2015). Rumen methanogens. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 143–150 pp. Springer India. DOI 10.1007/978-81-322-240-3_10
- Cheng KJ, Forsberg CW, Minato H, Costerton JW (1991). Microbial Ecology and Physiology of Feed Degradation within the Rumen. *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Academic Press, Inc. 595–624. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-702290-1.50031-x>
- Chenost M, Aufrère J, Macheboeuf D (2001). The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Animal Research*, 50(5), 349–364. <https://doi.org/10.1051/animres:2001137>
- Choudhury PK, Salem AZM, Jena R, Kumar S, Singh R, Puniya AK (2015). Rumen microbiology: an overview. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 1–36 pp. Springer India. DOI 10.1007/978-81-322-2401-3_1
- Cismileanu AE, Toma S (2017). Validation of *in vitro* ruminant digestibility method applied on Daisy incubator. *Animal Sciences and Biotechnologies*, 50(2): 8–10.
- Condren SA, Kelly A K, Lynch MB, Boland TM, Whelan SJ, Grace C, Rajauria G, Pierce KM (2019). The effect of by-product inclusion and concentrate feeding rate on milk production and composition, pasture dry matter intake, and nitrogen excretion of mid-late lactation spring-calving cows grazing a perennial ryegrass-based pasture. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1247–1256. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14970>
- Corley RN, Woldegebriel A, Murphy MR (1997). Evaluation of the nutritive value of kudzu (*Pueraria lobata*) as a feed for ruminants. *Animal Feed Science Technology*, 68(1-2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00038-2)

- Cruz-Peragón F, Palomar JM, Ortega A (2006). Ciclo energético integral del sector oleícola en la provincia de Jaén (España). *Grasas y aceites* 57(2), 219–228.
- Cutrignelli MI, D'Urso S, Tudisco R, Grossi M, Piccolo V (2007). Effect of ruminant species (bovine vs buffalo) and source of inoculum (rumen liquor vs faeces) on in vitro fermentation. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1), 295–297. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.295>.
- Czerkawski JW, Breckenridge G (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 38(3), 371–384. <https://doi.org/10.1079/bjn19770102>
- Damiran D, DelCurto T, Bohnert DW, Findholt SL (2008). Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 141(1–2), 15–35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.007>
- Damiran D, Yu P (2010). Chemical profile, rumen degradation kinetics, and energy value of four hull-less barley cultivars: comparison of the zero-amylose waxy, waxy, high-amylose, and normal starch cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(19), 10553–10559. DOI:10.1021/jf101624a
- Daza J, Benavides D, Pulido R, Balocchi O, Bertrand A, Keim J (2019). Rumen in vitro fermentation and in situ degradation kinetics of winter forage brassicas crops. *Animals*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani9110904>
- De Blas C, García Rebollar P, Cambra López, M, Torres AG (2008). Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. XXIV Curso de Especialización FEDNA - Avances En Nutrición y Alimentación Animal, 109–117.
- Deneka N, Canb A (2007). Use of faecal fluid for dry matter digestibility of ruminant feeds. *Journal of Applied Animal Research*, 31(1), 29–32. <https://doi.org/10.1080/09712119.2007.9706624>
- DePeters EJ, Fadel JG, Arana MJ, Ohanesian N, Etchebarne MA, Hamilton CA, Hinders RG, Maloney MD, Old CA, Riordan TJ, Perez-Monti H, Pareas JW (2000). Variability in the Chemical Composition of Seventeen Selected By-Product Feedstuffs Used by the California Dairy Industry. *Professional Animal Scientist*, 16(2), 69–99. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31670-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31670-3)
- Días R, Durante G (2015). Acidosis in cattle. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 315-327 pp. Springer Indian. DOI: 10.1007/978-81-322-2401-3_21
- Dopico-García MS, Figue A, Guerra L, Afonso JM, Pereira O, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM (2008). Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds?. *Talanta*, 75(5), 1190–1202. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.012>
- EC (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union*, 18102003.
- EC (2009) Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*, 26-02-2009.
- ECONOMETRICA (2015). Understanding the Changes to Global Warming Potential (GWP) Values. Disponible en: <http://ecometrica.com/assets/Understanding-the-Changes-to-GWPs.pdf>. (Consultado: enero 2022).

- Edwards A, Mlambo V, Lallo CHO, Garcia GW, Diptee MD (2012). In vitro ruminal fermentation of leaves from three tree forages in response to incremental levels of polyethylene glycol. *Open Journal of Animal Sciences*, 2(3), 142–149. <https://doi.org/10.4236/ojas.2012.23020>
- Egan AR, Ulyatt MJ (1980). Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 94(1), 47-56. doi:10.1017/S002185960002788X
- Egaña JI, Morales MS (1986). Metabolismo del nitrógeno en rumiantes. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 8(2).
- El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ (1998). Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining in vitro digestibility and gas production. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 673-679. <https://doi.org/10.4141/A97-109>
- El Shaer HM, Omed HM, Chamberlain AG (1987). Use of faecal organisms from sheep for the in vitro determination of digestibility. *Journal of Agricultural Science Cabrigde*, 109(2), 257-259. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080667>
- ESYRCE (2019). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos de España. Subsecretaría general técnica, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. N.I.P.O.: 003-19-051-9
- ESYRCE (2020). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos de España. Subsecretaría general técnica, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. N.I.P.O.: 003-19-051-9
- ESYRCE (2021). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos de España. Subsecretaría general técnica, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. N.I.P.O.: 003-19-051-9.
- FEDNA (2016). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/orujo-de-uva. (Consultado: febrero 2022)
- Figuerola ME, Redondo S, Luque MT, Fernández F, Naranjos EM, Vecino I, Castillo JM, Rubio A, Mena DM, Arenillas T, Suárez-Inclán LM (2007). Los sumideros naturales de CO₂, una estrategia sostenible entre el Cambio climático y el Protocolo de Kyoto desde las perspectivas urbana y territorial. Universidad de Sevilla. Páginas 11-36
- Fliegerova K, Kaerger K, Kirk P, Voigt K (2015). Rumen Fungi. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 97-112 pp. Springer India. DOI 10.1007/978-81-322-2401-3_7
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, López S, Bannik A (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83(2), 143-150. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000180>
- Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agriculture Research*, 2(2), 191-202
- Gargallo S, Calsamiglia S, Ferret A (2006). Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*, 84(8), 2163–2167. <https://doi.org/10.2527/jas.2004-704>
- Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A (2016). Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. In *Nutrition and Metabolic Insights*, 9, 59–64. <https://doi.org/10.4137/NMIS32910>
- Gerber PJJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G (2013). Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería. Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). <http://www.fao.org/3/a-i3437s.pdf>

- Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS, Becker K (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3–4), 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Getachew G, DePeters EJ, Robinson PH, Fadel JG (2005). Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 547–559. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.034>
- Gilbert RA, Klieve AV (2015). Ruminal viruses (Bacteriophages, Archaeophages). In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 121-141 pp. Springer Indian. DOI 10.1007/978-81-322-2401-3_9
- Goel G, Makkar HPS (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production* 44(4), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>
- Gómez M, Centeno A, Hernández N, Lleó L, Morales AM, Pérez MC, Pérez-López D, García A, García JM (2019). Fenoles: origen y evolución. VI Jornadas Nacionales Del Grupo de Olivicultura, 5.
- Goering HK, Van Soest PJ (1970). Forage fiber analyses. U.S. Department of Agriculture, 379, 387–598.
- Goopy JP (2019). Creating a low enteric methane emission ruminant: what is the evidence of success to the present and prospects for developing economies?. *Animal Production Science*, 59(10), 1769-1776. <https://doi.org/10.1071/AN18457>
- Granja-Salcedo YT, Ribeiro Júnior CS, de Jesus RB, Gomez-Insuasti AS, Rivera AR, Messana JD, Canesin RC, Berchielli TT (2016). Effect of different levels of concentrate on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nellore steers. *Archives of Animal Nutrition*, 70(1), 17–32. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2015.1117562>
- Guerrero RR, Valenzuela LA (2011). Agroindustria y medio ambiente. Trilogía. Ciencia Tecnología Sociedad, 3(33), 63-83.
- Herderich MJ, Smith PA (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 205–214. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00288.x>
- Hermoso M, González J, Uceda M, García-Ortíz A, Morales J, Frías L Fernández A (1996). Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Mairena del Aljarafe, Sevilla. I.S.B.N:84-89802-37-8.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, Branco AF, Moate PJ, Deighton MH, Williams SRO, Kindermann M, Duval S (2015). An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10663–10668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504124112>
- Holt MS, Yang SY, Creech JE, Eun JS, Young AJ (2016). In situ ruminal degradation kinetics of corn silage hybrids harvested prior to or at maturity in dry and lactating dairy cows. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(1), 46–53.
- INFOVI (2021). Sistema de información de mercados del sector vitivinícola, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Disponible en : <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/default.aspx> (Consultado: febrero 2022)

- IPCC (2013). Glosario [Planton, S. (ed.)]. En: Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América
- Jaso R (2021). Caracterización de lías de vino para su revalorización. Trabajo de fin de Master. Máster Universitario en Tecnología y Sostenibilidad en la Industria Alimentaria. Universidad Pública de Navarra. <https://hdl.handle.net/2454/40901>
- Jayanegara A, Wina E, Soliva CR, Marquardt S, Kreuzer M, Leiber F (2011). Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2–4), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.11.009>
- Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M (2012). Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 365-375. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x
- Jarrige A, Thivend P, Demarquilly C (1970). Development of a cellulolytic digestion for predicting the nutritive value of forages. *Proceedings of 11th International Grassland Congress*: 762-766. Queensland University Press
- Jouany JP, Thivend P (1986). *In vitro* effects of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 15(3), 215–229. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(86\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(86)90027-1)
- Junta de Extremadura (2021). Empleo por sectores en Extremadura 2020. Secretaría General de Economía y Comercio, Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital. Junta de Extremadura.
- Kamalak A, Canbolat O, Gurbuz Y, Ozay O (2005). Comparison of *in vitro* gas production technique with *in situ* nylon bag technique to estimate dry matter degradation. *Czech Journal of Animal Science*, 50(2), 60–67. <https://doi.org/10.17221/3996-cjas>
- Kansri B, Filippo G, y B. J. (2018). Informe aceptado por el Grupo de Trabajo I del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático pero no aprobado en detalles. Cuarto Informe de Evaluación Del Grupo Intergubernamental de Expertos Sobre Cambio Climático (IPCC) Editores: Kansri B., Filippo G., y Bubu J, 77. http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4_wg1_full_report.pdf
- Kitessa S, Flinn PC, Irish GG (1999). Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(5), 825–841. <https://doi.org/10.1071/AR98169>
- Kobayashir Y (2010). Abatement of methane production from ruminants: Trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 410–416. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.01>
- Krishnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke K (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(2-3), 177-188. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00734-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00734-5)
- La Cal JA (2020). Estrategias para la transformación de las industrias del sector oleícola (almazaras y extractoras de aceite de orujo) en bioindustrias. I.S.B.N.: 978-84-09-19035-5
- Launchbaugh KL, Provenza FD, Pfister JA (2001). Herbivore response to anti-quality factors in forages. *Journal of Range Management*, 54(4), 431–440. <https://doi.org/10.2307/4003114>

- Leek BF (2009). Digestión en el estómago de los rumiantes. En: Dukes Fisiología de los animales domésticos de. Ed. W.O. Reece. Acribia Zaragoza.
- Lee J, Harris PM, Sinclair BR, Treloar BP (1992). The effect of condensed tannin containing diets on whole body amino acid utilisation in Romney sheep: consequences for wool growth. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 52, 243-245.
- Lee SS, Ha JK, Cheng KJ (2001). Effects of LCFA on the gas production, cellulose digestion and cellulase activities by the rumen anaerobic fungus, *neocallimastix frontalis* RE1. *Asian Australian Journal Science*, 14(8), 1110-1117.
- Lima PR, Apdini T, Freire AS, Santana AS, Moura LML, Nascimento JCS, Rodrigues RTS, Dijkstra J, Garcez Neto AF, Queiroz MAÁ, Menezes DR (2019). Dietary supplementation with tannin and soybean oil on intake, digestibility, feeding behavior, ruminal protozoa and methane emission in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 249, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.017>
- Liu Y, Whitman WB (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- López B (2011). Nuevas tecnologías de cebo intensive de corderos: uso de subproductos agroindustriales. Trabajo fin de Master. Master de Zootecnia y Gestión Sostenible. Universidad de Córdoba. http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/05_12_58_Beatriz_Lopez_de_los_Santos.pdf
- Lovett DK, O'Mara FP (2002). Estimation of enteric methane emissions originating from the national livestock beef herd: a review of the IPCC default emission factors. *Tearmann*, 2(1), 77-83.
- Maestro-Durán R, León R, Ruíz V (1994). Compuestos fenólicos del olivo (*Olea europaea*). *Grasas Y Aceites*, 45(4), 265-269. <https://doi.org/10.3989/egeogr.2001.i245.267>
- Madsen J, Hvelplund T (1994). Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. *Livestock Production Science*, 39(2), 201–212. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(94\)90185-6](https://doi.org/10.1016/0301-6226(94)90185-6)
- Makkar HPS (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*, 55–88.
- Manzano P (2019). Ganadería extensiva, una opción sostenible también para el clima. *Ecologista* 99. Disponible en: <https://www.ecologistasenaccion.org/119603/ganaderia-extensiva-una-opcion-sostenible-tambien-para-el-clima/> (Consultado: enero 2022).
- MAPA (2016). Gases de efecto invernadero en ganadería. III Jornada Ganadería y Medio Ambiente: Ganadería y gases de efecto invernadero. 20 octubre 2016, Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MAPA (2020). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/ganado-ovino.aspx> (Consultado: febrero 2022)
- Marten GC, Barnes RF (1979). Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. *Proceedings of Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa, Canada. 61-71
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>
- Martínez MM, Ortega R, Janssens M, Fincheira P (2019). Grape pomace compost as a source of organic matter: Evolution of quality parameters to evaluate maturity and stability. *Journal of Cleaner Production*, 216, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.156>

- Mathison GW, Okine EK, McAllister TA, Dong Y, Galbraith J, Dmytruk OIN (1998). Reducing Methane Emissions from Ruminant Animals, *Journal of Applied Animal Research*, 14(1), 1-28. DOI: 10.1080/09712119.1998.9706212
- Mauricio RM, Owen E, Mould FL, Givens I, Theodorou MK, France J, Davies DR, Dhanoa MS (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*, 89(1-2), 33-48. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00234-0)
- McBee RH (1953). Manometric method for the evaluation of microbial activity of rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied Microbiology*, 1(2), 106-110. <https://doi.org/10.1128/aem.1.2.106-110.1953>
- McDonald I (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, 96(1), 251-252. <https://doi.org/10.1017/S0021859600032081>
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2010). *Animal Nutrition*. 7th Ed. Prentice Hall, Harlow, England, U.K. ISBN 978-1408204238.
- McMahon LR, McAllister TA, Berg BP, Majak W, Acharya SN, Popp JD, Coulman BE, Wang Y, Cheng K, Canada AF (2000). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(3), 469-485. <https://doi.org/10.4141/P99-050>
- McSweeney CS, Palmer B, Bunch R, Krause DO (2001). Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 78-88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01220.x>
- Mehrez AZ, Ørskov ER (1977). A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 88(3), 645-650. <https://doi.org/10.1017/S0021859600037321>
- Melgar A, Welter KC, Nedelkov K, Martins CMMR, Harper MT, Oh J, Räisänen SE, Chen X, Cueva SF, Duval S, Hristov AN (2020). Dose-response effect of 3-nitrooxypropanol on enteric methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 6145-6156. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17840>
- Membrive CM (2016). Anatomy and physiology of the rumen. 1-38 pp. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_1
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (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. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), 217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>
- Menke KH, Steingass H (1988). Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Mertens DR (1987). Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal Animal Science*, 64, 1548-1558. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6451548x>
- Michalet-Doreau B, Ould-Bah MY (1992). In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 40(1), 57-86. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90112-J](https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90112-J)
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1-4), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)

- Min BR, Solaiman S (2018). Comparative aspects of plant tannins on digestive physiology, nutrition and microbial community changes in sheep and goats: a review. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(5), 1181-1193. DOI: 10.1111/jpn.12938
- Min BR, Solaiman S, Waldrip HM, Parker D, Todd RW, Brauer D (2020). Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: A review of plant tannin mitigation options. *Animal Nutrition*, 6(3), 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.05.002>
- Miranda MT, Arranz JI, Román S, Rojas S, Montero I, López M, Cruz, JA (2011). Characterization of grape pomace and pyrenean oak pellets. *Fuel Processing Technology*, 92(2), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.05.035>
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N (2008). Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants: A review. *World Journal of Zoology*, 3(2), 40–46. [http://www.idosi.org/wjz/wjz3\(2\)2008/2.pdf](http://www.idosi.org/wjz/wjz3(2)2008/2.pdf)
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N (2016). Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants: Microbiology and biotechnology strategies. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 4(1), 22-31. <http://dx.doi.org/10.14269/2318-1265/jabb.v4n1p22-31>
- MITECO (2021). Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Inventario nacional de emisiones de gases de efecto invernadero: Informe resumen. Edición 1990-2019. Informe resumen. 7. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/documentoresumeninventariogei-ed2021_tcm30-524841.pdf
- Mohamed R, Chaudhry AS (2008). Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews*, 21(1), 68–81. <https://doi.org/10.1017/S0954422408960674>
- Molina-Alcaide E, Yáñez-Ruiz DR (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1–3), 247–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.021>
- Moreira FB, Prado IN, Cecato U, Wada FY, Mizubuti IY (2004). Forage evaluation, chemical composition, and in vitro digestibility of continuously grazed star grass. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1–4), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.009>
- Moss AR (1994). Methane production by ruminants. I.-Dietary manipulation to reduce methane production. II.- Laboratory procedures for estimating methane potential of diets. *Nutrition Abstracts and Reviews (B)*, 64(12), 785-806
- Moss AR, Jouany JP, Newbold J (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de zootechnie*, 49(3), 231-253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Mould FL, Kliem KE, Morgan R, Mauricio RM (2005). In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 31–50. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.028>
- Moumen A, Azizi G, Chekroun KB, Baghour M (2016). The effects of livestock methane emission on the global warming: A review. *International Journal of Global Warming*, 9(2), 229–253. <https://doi.org/10.1504/IJGW.2016.074956>
- Mueller-Harvey I (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2010–2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- Muñoz DM, Fernando Cuatin MI, Pantoja AJ (2013). Potencial energético de residuos agroindustriales del departamenteo de cauca, a partir del poder calorífico inferior. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2) 156-163.

- Nagaraja TG (2016). Microbiology of the rumen. In *Rumenology*. 39-61 pp. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2
- Naumann HD, Tedeschi LO, Zeller WE, Huntley NF (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: Advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(12), 929–949. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017001200009>
- Novak I, Janeiro P, Seruga M, Oliveira-Brett AM (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 630(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.002>
- Nozière P, Glasser F, Sauvant D (2011). In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: A quantitative review by an empirical approach. *Animal*, 5(3), 403–414. <https://doi.org/10.1017/S1751731110002016>
- Nunes MA, Pimentel F, Costa A, Alves RC, Oliveira MBPP (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.016>
- Olagaray KE, Bradford BJ (2019). Plant flavonoids to improve productivity of ruminants: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 21-36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.02.004>
- ONU (1992). Convención marco de las Naciones Unidas sobre cambio climático. New York, USA.
- Orskov ER, Hovell FDD, Mould F (1980). The use of nylon bag technique in the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production*, 5(3), 195–213.
- Orskov ER, McDonald I (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499–503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Ortiz DM, Posada SL, Noguera RR (2014). Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 26(11).
- Owens FN, Basalan M (2016). Ruminal fermentation. In *Rumenology*. 63–102 pp. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_3
- Owens FN, Hanson CF (1992). External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 75(9), 2605-2617. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78023-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78023-0)
- Owens FN, Zinn R (1988). Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. 255-282 pp. Editorial Acribial.
- Pagella JH, Mayes RW, Pérez-Barbería FJ, Orskov ER (2017). The development of an intraruminal nylon bag technique using non-fistulated animals to assess the rumen degradability of dietary plant materials. *Animal*, 12(1), 54–65. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001203>
- Palma-Hidalgo JM, Belanche A, Jiménez E, Martín-García AI, Newbold CJ, Yáñez-Ruiz DR (2021). Short communication: Saliva and salivary components affect goat rumen fermentation in short-term batch incubations. *Animal*, 15(7), 100267. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100267>
- Pandian CS, Reddy TJ, Sivaiah K, Blummel M, Reddy YR (2016). Faecal matter as inoculum for in vitro gas production technique. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16(2), 271–281. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2016.00023.8>

- Patra A K, Saxena J (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11–12), 1198–1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>
- Patra A, Park T, Kim M, Yu Z (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Rasouli B, Amiri B (2016). Nutritive Value Assessment of Three Rangeland Species Using Sheep Rumen and Feces Fluid. *Environmental Resources Research*, 4(2), 141-152.
- Relling AE, Mattioli GA (2003). Fisiología Digestiva de los Rumiantes. En *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes* (Ed. Universidad de la Plata), pp 5-72. ISBN: 950-34-02387-7.
- Restrepo C, Noguera RR, Posada SL (2016). Efecto de la sustitución energética del maíz (*Zea mays*) en dietas para rumiantes sobre la producción de metano in vitro. *Livestock Research for Rural Development* 28(10). http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/13639/1/RestrepoCatalina_2016_%20EfectoSustitucionEnergeticaMaiz.pdf
- Ribera del Guadiana, Denominacion de Origen. Disponible en: <https://www.riberadelguadiana.eu/consejo-regulador/region-y-subzonas> (Consultado: febrero 2022).
- Robertson LJ, Waghorn GC (2002). Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 62, 213-218
- Roca B, Beltrán M, Gómez (2019). Change climate and health. *Revista Clínica Española*, 219(5), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2019.01.004>
- Rodríguez R. (2002). Mejora de una bodega de vino tinto con denominación de origen Ribera del Guadiana en Valdefuentes (Cáceres). Proyecto Fin de Carrera. Escuela Universitaria de Ingenieros Agrónomos. Ciudad Real.
- Rodríguez G, Lama A, Rodríguez R, Jiménez A, Guillén R, Fernández-Bolaños J (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. In *Bioresource Technology*, 99(13), 5261–5269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027>
- Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, McKain N, Ross DW, Hyslop JJ, Waterhouse A, Freeman TC, Watson M, Wallace RJ (2016). Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLOS Genetics*, 12(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005846>
- Romangosa V (1979). Orujos de vinificación en alimentación de rumiantes. Ministerio de Agricultura. Publicaciones de Extensión Agraria, 5747.
- Romero-García JM, Niño L, Martínez-Patiño C, Álvarez C, Castro E, Negro MJ (2014). Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresource Technology*, 159, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.062>
- Ronda A, Martín-Lara MA, Calero M, Blázquez G (2015). Complete use of an agricultural waste: Application of untreated and chemically treated olive stone as biosorbent of lead ions and reuse as fuel. *Chemical Engineering Research and Design*, 104, 740–751. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.10.021>
- Rosas-Calleja D, Ortiz-Laurel H, Leyva-Ovalle, Herrera-Corredor, J (2016). Revaluation of some agroindustrial residues and their potential for application on agricultural soils. *Agroproductividad* 9(8), 18–23.

- Rotger A (2004). Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo. 196. <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5667/arc1de1.pdf?sequence=1>
- Russow A, Raffrenato E, Chaucheyras-Durand F, Cheveau E (2016). On the way to optimize the two stage Tilley and Terry technique for a more accurate in vitro assessment of rumen modifiers. *Journal of Animal Science*, 94 (5), 795- 796.
- Sancho P, Amores A, Jiménez A, Palacios V (2020). Physicochemical and Nutritional Characterization of Winemaking Lees: A New Food Ingredient. *Agronomy*, 10(7), 996. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070996>
- Sauer FD, Fellner V, Kinsman R, Kramer JKG, Jackson HA, Lee A J, Chen S (1998). Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 76(3), 906–914. <https://doi.org/10.2527/1998.763906x>
- Savarese M, De Marco E, Sacchi R (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105(2), 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.037>
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2980–2991. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>
- Shibata M, Terada F (2010). Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal*, 81(1), 2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00687.x>
- Shingfield KJ, Jaakkola S, Huhtanen P (2002). Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on diet digestibility, rumen fermentation, blood metabolite concentrations and nutrient utilisation of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 97(1-2), 1-21. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00006-8)
- Silanikove N, Nitsan Z, Perevolotsky A (1994). Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2844-2847
- SIMO (2021). Sistema de Información de los Mercados Oleícolas. Informe mensual de la situación de mercado del sector del aceite de oliva y la aceituna de mesa. Campaña 2020/2021. Subdirección General de Cultivos Herbáceos, Industriales y Aceite de Oliva. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/avances.aspx>. (Consultado: febrero 2022)
- Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E, Bharathiraja B (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314, 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- Sofyan A, Sakti AA, Herdian H, Khairulli G, Suryani AE, Karti PDM, Jayanegara A (2017). In vitro gas production kinetics and digestibility of king grass (*Pennisetum hybrid*) added by organic mineral and natural crude tannin. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 122–125. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1129339>
- Stern MD, Bach A, Calsamiglia S (1997). Alternative Techniques for Measuring Nutrient Digestion in Ruminants. *Journal of Animal Science*, 75(8), 2256–2276. <https://doi.org/10.2527/1997.7582256x>
- Tagawa S, Holtshausen L, McAllister TA, Yang WZ, Beauchemin KA (2017). Effects of particle size of processed barley grain, enzyme addition and microwave treatment on in vitro disappearance and gas production for feedlot cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(4), 479–485. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0351>

- Tan HY, Sieo CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD, Ho YW (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3–4), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004>
- Tassone S, Fortina R, Peiretti PG (2020). In vitro techniques using Daisy II incubator for the assessment of digestibility: a review. *Animals*, 10, 775. doi:10.3390/ani10050775
- Tilley JMA, Terry RA (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18(2), 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Trei J, Hale WH, Theurer B (1970). Effect of grain processing on in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, 30(5), 825-831. <https://doi.org/10.2527/jas1970.305825x>
- Udén P, Van Soest PJ (1984). Investigations of the in situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science*, 58(1), 213–221. <https://doi.org/10.2527/jas1984.581213x>
- UE (2013). REGLAMENTO (UE) N° 1308/2013 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n o 922/72, (CEE) n o 234/79, (CE) n o 1037/2001 y (CE) n o 1234/2007. *Diario Oficial de la Unión Europea*, de 20 de diciembre de 2013, pp. 347/671
- Van Soest PJ (1967). Development of a Comprehensive System of Feed Analyses and its Application to Foragesfile. *Journal of Animal Science*, 26(1), 119-128.
- Van Soest PJ (1982). Carbohidrates. In: *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª edition. Cornell University Press.USA. I.S.B.N: 0-8014-2772-X
- Van Soest PJ (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª edition. Cornell University Press.USA. I.S.B.N: 0-8014-2772-X
- Van Wesemael D, Vandaele L, Ampe B, Cattrysse H, Duval S, Kindermann M, Fievez V, De Campeneere S, Peiren N (2019). Reducing enteric methane emissions from dairy cattle: Two ways to supplement 3-nitrooxypropanol. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1780–1787. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14534>
- Vanzant ES, Cochran RC, Titgemeyer EC, Stafford SD, Olson KC, Johnson DE, Jean G (1996). In Vivo and in Situ Measurements of Forage Protein Degradation in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, 74(11), 2773–2784. <https://doi.org/10.2527/1996.74112773x>
- Vargas A, Pérez L (2018). Use of agro-industrial waste in improving the quality of the environment. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>
- Waghorn GC, Stafford KJ (1993). Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 36(4), 493–497. <https://doi.org/10.1080/00288233.1993.10417750>
- Waghorn GC, Shelton ID, McNabb WC, McCutcheon SN (1994). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 123(1), 109-119. <https://doi.org/10.1017/S0021859600067836>

- Wallace RJ, Rooke JA, Duthie CA, Hyslop JJ, Ross DW, McKain N, Souza M, Snelling TJ, Waterhouse A, Roehe R (2014). Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. *Scientific Reports*, 4(1), 1-8. DOI: 10.1038/srep05892
- Wright ADG (2015). Rumen protozoa. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 113-120 pp. Springer Indian. DOI: 10.1007/978-81-322-2401-3_8
- Yan T, Agnew RE, Gordon FJ, Porter MG (2000). Prediction of methane energy output in dairy and beef cattle offered grass silage-based diets. *Livestock Production Science*, 64(2-3), 253-263. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00145-1)
- Yoshida T, Hatano T, Ito H (2000). Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *BioFactors*, 13(1-4), 121-125. <https://doi.org/10.1002/biof.5520130120>
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646. doi:10.3390/ijms11020622
- Xu A, Lin L, Guo K, Liu T, Yin Z, Wei C (2019). Physicochemical properties of starches from vitreous and flourey endosperms from the same maize kernels. *Food Chemistry*, 291, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.024>
- Zhou HC, Lin YM, Wei SD, Tam NFY (2011). Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. *Food Chemistry*, 129(4), 1710-1720. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.036>
- Zhou M, Chen Y, Guan LL (2015). Rumen bacteria. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 79-95 pp. Springer India. DOI 10.1007/978-81-322-2401-3_6

Anexos

LISTADO DE ABREVIATURAS

AGV:	ácidos grasos volátiles.
CH₄:	metano.
CD:	coeficiente de digestibilidad.
CO₂:	dióxido de carbono.
CO₂-eq:	dióxido de carbono equivalente.
C.B:	cenizas brutas.
CaCl₂ 2H₂O:	cloruro cálcico bihidratado.
CoCl₂ 6H₂O:	cloruro de cobalto hexahidratado.
E.E:	extracto etéreo.
F.B:	fibra bruta.
FeCl₃ 6H₂O:	cloruro férrico hexahidratado.
F.N.D:	fibra neutro detergente.
F.A.D:	fibra ácido detergente.
GEI:	gases de efecto invernadero.
G.B:	grasa bruta.
GT:	gigatonelada.
H:	humedad.
H₂:	hidrógeno.
H.C:	hidratos de carbono.
HCl:	ácido clorhídrico.
HFC:	hidrofluorocarbonos.
KH₂PO₄:	fosfato potásico monobásico.

L.A.D:	lignina ácido detergente.
M.S:	materia seca.
M.O:	materia orgánica.
MgSO₄ 7H₂O:	sulfato magnésico heptahidratado.
MnCl₂ 4H₂O:	cloruro magnésico tetrahidratado.
NaOH:	hidróxido de sodio.
NaHCO₃:	bicarbonato sódico.
NH₃:	amoníaco.
N₂O:	óxido nitroso.
NNP:	nitrógeno no proteico.
Na₂HPO₄:	fosfato sódico dibásico.
Na₂S 7H₂O:	sulfuro sódico heptahidratado.
PCG:	potencial del calentamiento global.
PFC:	perfluorocarbonos.
P.B:	proteína bruta.
SF₆:	hexafluoruro de azufre.
%DMO:	porcentaje de digestibilidad de la materia orgánica.
3NOP:	3-nitroxipropanol.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución del censo ovino en España. Fuente: (MAPA, 2020).....	11
Figura 2.- Concentración de GEI en la atmósfera. Elaboración propia, fuente: (MITECO, 2021).....	18
Figura 3.- Emisiones de GEI globales en las cadenas de suministro ganadero. Fuente: (Gerber <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figura 4.- Emisiones nacionales de GEI del sector agroganadero, fuentes de emisión de CH ₄ . Elaboración propia, fuente: (MITECO, 2021).....	20
Figura 5.- Vista lateral derecha de un bovino adulto. Diferentes segmentos anatómicos del aparato digestivo: esófago, retículo, rumen, omaso y abomaso. Fuente: (Membrive, 2016).....	21
Figura 6.- Clasificación de los hidratos de carbono. Elaboración propia, fuente: (Van Soest, 1982).....	24
Figura 7.- Fermentación de los carbohidratos en el rumen. Elaboración propia, fuente: (Leek, 2009).....	26
Figura 8.- Degradación y fermentación de los compuestos nitrogenados en el rumen. Síntesis de proteína microbiana. Adaptado, fuente: (Rotger, 2004).....	28
Figura 9.- Fermentación de compuestos lipídicos en el rumen. Adaptado, fuente: (Nagaraja, 2016).....	30
Figura 10.- Formación y excreción de CH ₄ en el aparato digestivo de animal rumiante. Fuente (MAPA, 2016).....	31
Figura 11.- Subzonas vitivinícolas de Extremadura. Adaptado, fuente: (Ribera del Guadiana D.O).....	41

Figura 12.- Evolución de la superficie de viñedo (hectáreas) en Extremadura 2013-2021. Elaboración propia, fuente: (ESYRCE, 2019, 2020 y 2021).....	41
Figura 13.- Partes de la uva. Elaboración propia.....	42
Figura 14.- Simplificación del proceso de elaboración del vino, subproductos y destinos. Elaboración propia, fuente (Rodríguez, 2002).....	45
Figura 15.- Evolución de la superficie de olivar en Extremadura 2013-2021. Elaboración propia, fuente: (ESYRCE, 2019, 2020 y 2021).....	46
Figura 16.- Simplificación del proceso de transformación de la aceituna. Elaboración propia, fuente: (Romero-García <i>et al.</i> , 2014).....	50
Figura 17.- Métodos empleados para la determinación del valor nutritivo de los alimentos. Fuente: (McDonald <i>et al.</i> , 2010).....	51
Figura 18.- Curva de producción de gas de la cebada tras proceso de fermentación <i>in vitro</i> . Elaboración propia.....	59
Figura 19.- Análisis inmediato o esquema de partición de Weende. Elaboración propia, fuente: (EC, 2009).....	71
Figura I. 1.- Producción de gas (ml/g) tras 96h de fermentación.....	95
Figura I. 2.- Modelización de la producción de gas Orskov y McDonald (1979) (O-McD) y McDonald (1981) (McD) para orujos blancos.....	100
Figura I. 3.- Modelización de la producción de gas Orskov y McDonald (1979) (O-McD) y McDonald (1981) (McD) para orujos tintos.....	100
Figure II. 1.- Gas production after 18h of fermentation.....	123
Figure II. 2.- CH ₄ production after 18 h of fermentation.....	123
Figura IV. 1.- Producción de CH ₄ (ml/g de sustrato fermentado) en función del % de cebada incorporado en la mezcla de cebada/maíz.....	171
Figura IV. 2.- Producción de CH ₄ (ml/g de sustrato fermentado) en función de los ml de gas producidos en un sistema de mezcla cebada/maíz.....	171

Figura IV. 3.- Cinética de producción de gases de los diferentes concentrados
experimentales (ml/g sustrato fermentado)..... **173**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de las bacterias ruminales en función del sustrato degradado. Fuente: (Relling y Mattioli, 2003).....	22
Tabla 2.- Reactivos bases, elaboración de la saliva artificial.....	74
Tabla I. 1.- Composición química de los orujos de estudio, expresado en g/kg de materia seca.....	94
Tabla I. 2.- Producción de gas (ml/g) y CH ₄ (mlCH ₄ /g) tras 18h de fermentación.....	96
Tabla I. 3.- Producción de gas (ml/g) y CH ₄ (mlCH ₄ /g) tras 96h de fermentación.....	96
Tabla I. 4.- Modelización de la producción de gas, parámetros de la ecuación de Orskov y McDonald (1979) y McDonald (1981).....	97
Table II. 1.- Chemical composition of barley, pomaces and pomace-barley mixtures expressed in g/kg dry matter (mean ± standard deviation)	117
Table II. 2.- Gas (ml/g fermented substrate) and CH ₄ (ml/g fermented substrate) production after 18h of fermentation.....	118
Table II. 3.- Kinetics of gas production (ml/g fermented substrate) and CH ₄ (ml/g fermented substrate) production after 96h of fermentation of the varieties of pomace studied.....	119
Table II. 4.- Kinetics of gas production (ml/g fermented substrate) and CH ₄ (ml/g fermented substrate) production after 96h of fermentation of the different levels of pomace studied.....	121
Table II. 5.- Gas production modelling after 96h of fermentation. Parameters of the equation McDonald, (1981) $Y=a+b(1-e^{-c(t-t_l)})$	124
Tabla III. 1- Análisis químico de las mezclas cebada/hoja de olivo (expresadas en % de materia seca).....	142

Tabla III. 2.- Producción de gas (ml/g sustrato fermentado) y CH ₄ (ml CH ₄ /g sustrato fermentado) tras 24h de incubación, expresadas por su media ± desviación típica.....	142
Tabla III. 3.- Composición químico-nutritiva de los ensilados de hoja de olivo (expresadas en % de materia seca).....	144
Tabla III. 4.- Efecto de la urea y melaza sobre las características fermentativas y valor energético <i>in vitro</i> de los ensilados de hoja de olivo.....	145
Tabla III. 5.- Valor energético y producción de CH ₄ <i>in vitro</i> del subproducto hoja de olivo ensilado, fresco y desecado.....	147
Tabla IV. 1.- Análisis químico de las mezclas cebada/maíz (media ± desviación típica) expresado en materia seca.....	169
Table IV. 2.- Producción de gas y CH ₄ de las mezclas cebada/maíz tras 18h de incubación (media ± desviación típica).....	170
Table IV. 3.- Análisis químico de los concentrados experimentales (media ± desviación típica).....	172
Table IV. 4.- Producción de gas y CH ₄ tras un periodo de fermentación de 96h.....	174
Table IV. 5.- Producción de gas y CH ₄ tras un periodo de fermentación de 18h (media ± desviación típica).....	175

