

BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE ÁCIDOS GRASOS EN CARNEROS COMPLEMENTADOS CON *Saccharomyces cerevisiae*

RUMINAL BIOHYDROGENATION OF FATTY ACIDS IN RAMS COMPLEMENTED WITH *Saccharomyces cerevisiae*

Adrián Gloria-Trujillo¹, David Hernández-Sánchez^{1*}, Omar Hernández-Mendo¹, María M. Crosby-Galván¹,
Edgar Meraz-Romero², Miguel Á. Mata-Espinosa³, René Pinto-Ruiz⁴

¹Postgrado en Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Campus Motecillo. 56230. km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México. (sanchezd@colpos.mx). ²Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA). FMVZ-UNAM. 76790. Tequisquiapan, Querétaro. México. ³Sistemas Pecuarios, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). 35230. Bermejillo, Durango, México. ⁴Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma de Chiapas. 29000. Villaflores, Chiapas, México.

RESUMEN

Las dietas ricas en grano disminuyen el pH ruminal y afectan las poblaciones bacterianas relacionadas con la biohidrogenación. Esto reduce la producción de ácido esteárico, que es precursor de ácidos grasos insaturados en músculo y afecta la calidad nutricional de la carne. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) permite la estabilización del pH para la función ruminal eficiente. Esto permitiría estabilizar la biohidrogenación en corderos alimentados con una dieta concentrada. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de Sc en la biohidrogenación ruminal de ácidos grasos de cadena larga en carneros. Cuatro carneros Rambouillet (72.35 ± 4.6 kg PV) con cánula ruminal y duodenal se alimentaron 3 d con 80 % de alimento concentrado complementado con 3, 5 y 10 g d⁻¹ de Sc por carnero. En el fluido ruminal se evaluó pH, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal. En el fluido ruminal y duodenal se midió el porcentaje de ésteres de ácidos grasos metilados, y el porcentaje de biohidrogenación ruminal se calculó. El diseño experimental fue un 4 × 4 cruzado con cuatro periodos de evaluación. Los muestreos se hicieron cada 4 h por 12 h cada día. El efecto fijo de los tratamientos se incluyó en el análisis y las medias se separaron con la opción PDIFF de LSMEANS. La biohidrogenación ruminal se analizó con polinomios ortogonales para probar el efecto lineal y cuadrático. La complementación con Sc no modificó el pH ruminal, ácidos grasos volátiles ni el N amoniacal (p > 0.05). La biohidrogenación ruminal fue similar entre tratamientos (oleico;

ABSTRACT

Grain-rich diets decrease ruminal pH and affect bacterial populations related to biohydrogenation. This reduces the production of stearic acid, which is a precursor of unsaturated fatty acids in muscle and affects the nutritional quality of meat. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) stabilizes pH and allows an efficient ruminal function. This would stabilize the biohydrogenation in lambs fed with a concentrated diet. The objective of the study was to evaluate the effect of Sc in the ruminal biohydrogenation of long-chain fatty acids in rams. Four Rambouillet rams (72.35 ± 4.6 kg PV) with ruminal and duodenal cannula were fed 3 d with 80 % of concentrates, supplemented with 3, 5, and 10 g d⁻¹ of Sc per ram. pH, volatile fatty acids, and ammoniacal nitrogen were evaluated in ruminal fluid. The percentage of fatty acid methyl esters in ruminal and duodenal fluid was measured, along with the percentage of ruminal biohydrogenation. The experimental design was 4 × 4 cross-over with four evaluation periods. Samples were taken every 4 h per 12 h each day. The fixed effect of the treatments was included in the analysis and the means were separated using the PDIFF option of LSMEANS. Ruminal biohydrogenation was analyzed based on orthogonal polynomials, in order to test the linear and quadratic effect. Sc complementation did not modify the ruminal pH, volatile fatty acids, or ammoniacal N (p ≥ 0.05). The ruminal biohydrogenation was similar between treatments (oleic: T1: 80.04, T2: 79.89, T3: 80.89, T4: 81.03 %; linoleic: T1: 90.27, T2: 89.60, T3: 90.92, T4: 90.51 %; and linolenic; T1: 88.61, T2: 87.89, T3: 88.65, T4: 88.84 %). Sc levels do not modify the ruminal dynamics or the biohydrogenation of long-chain fatty acids.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: diciembre, 2017. Aprobado: marzo, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 13-23. 2019.

T1: 80.04, T2: 79.89, T3: 80.89, T4: 81.03 % linoleico; T1: 90.27, T2: 89.60, T3: 90.92, T4: 90.51 % y linolénico; T1: 88.61, T2: 87.89, T3: 88.65, T4: 88.84 %). Los niveles de Sc no modifican la dinámica ruminal ni la biohidrogenación de ácidos grasos de cadena larga.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, biohidrogenación, carneros, composición de ácidos grasos, fluido ruminal.

INTRODUCCIÓN

La composición de ácidos grasos en productos de rumiantes y su efecto en la salud humana se han evaluado (Castro-Hernández *et al.*, 2014; Ishlak *et al.*, 2015). En la síntesis de ácidos grasos influyen factores intrínsecos del animal, como la edad, raza, sexo y tipo de alimentación (Ballin, 2010). Los lípidos en la dieta de rumiantes se hidrolizan a ácidos grasos libres en el rumen y los microorganismos los aprovechan mediante el proceso de biohidrogenación (Cruz-González *et al.*, 2014). En la biohidrogenación las poblaciones bacterianas, principalmente las celulolíticas reducen el número de enlaces dobles en los ácidos grasos (Buccioni *et al.*, 2012), esto genera ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y monounsaturados (Cruz-González *et al.*, 2014). La población de bacterias celulolíticas se reduce cuando el rumiante consume alimentos concentrados (Buccioni *et al.*, 2012). Esta situación favorece la saturación parcial de ácidos grasos insaturados, como el linoleico y linolénico, y reduce la producción de esteárico; esto incrementa la acumulación de ácidos grasos *trans* en contenido digestivo y tejidos (Apás *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2017). Los ácidos grasos *trans* se asocian con efectos perjudiciales en la salud humana (FAO, 2010). Es el caso del C18:1 *trans* 10, que se relaciona con enfermedades cardiovasculares (Hodgson *et al.*, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) estabiliza el pH ruminal (Throne *et al.*, 2009) y optimiza la concentración de bacterias celulolíticas (Jurkovich *et al.*, 2014). Estas características podrían mejorar el aprovechamiento de lípidos (Titi *et al.*, 2008) en rumen e incrementar la biohidrogenación ruminal. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la composición de ácidos grasos de cadena larga en fluido ruminal y duodenal y la biohidrogenación ruminal en carneros alimentados con una dieta alta en alimento concentrado complementado con Sc.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, biohydrogenation, rams, fatty acid composition, ruminal fluid.

INTRODUCTION

Castro-Hernández *et al.* (2014) and Ishlak *et al.* (2015) have evaluated the composition of fatty acids in ruminant products and their effect on human health. Intrinsic factors of the animal, such as age, race, sex, and type of feeding, influence the synthesis of fatty acids (Ballin, 2010). Lipids in the diet of ruminants are hydrolyzed and become free fatty acids in the rumen, and the microorganisms take advantage of them through the biohydrogenation process (Cruz-González *et al.*, 2014). During biohydrogenation, bacterial populations (mainly cellulolytics) reduce the number of double bonds in fatty acids (Buccioni *et al.*, 2012); this generates saturated (palmitic and stearic) acids and monounsaturated fatty acids (Cruz-González *et al.*, 2014). The population of cellulolytic bacteria is reduced when the ruminant consumes concentrated feed (Buccioni *et al.*, 2012). This situation favors the partial saturation of unsaturated fatty acids (such as linoleic and linolenic acids) and reduces stearic acid production, increasing the accumulation of trans fatty acids in digestive content and tissues (Apás *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2017). Trans fatty acids are associated with harmful effects on human health (FAO, 2010). For example, C18:1 *trans* 10 is related to cardiovascular diseases (Hodgson *et al.*, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) stabilizes the ruminal pH (Throne *et al.*, 2009) and optimizes the concentration of cellulolytic bacteria (Jurkovich *et al.*, 2014). These features could improve the use of lipids (Titi *et al.*, 2008) in rumen, and increase the ruminal biohydrogenation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the composition of long-chain fatty acids in the ruminal and duodenal fluid, and the ruminal biohydrogenation in rams fed with a diet high in concentrated feed supplemented with Sc.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

The study was carried out in the Granja Experimental of Colegio de Postgraduados, in Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico. Four Rambouillet rams (72.35 ± 4.6 kg live weight) with ruminal and duodenal cannula were used in this study. The

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

El estudio se realizó en la Granja Experimental del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, y se usaron cuatro carneros Ramboulet (peso vivo 72.35 ± 4.6 kg) con cánula en rumen y duodeno. El protocolo experimental relacionado con el manejo y cuidado de los animales se estableció con base a los lineamientos descritos en la NOM-062-ZOO-1999. El diseño experimental fue un 4×4 cruzado. Los carneros se adaptaron por 10 d a la dieta y los muestreos de fluido ruminal y duodenal se hicieron por 3 d. La alimentación incluyó 80 % de Engorda Cordero Plus® y 20 % de alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada. Los tratamientos (T) fueron 0 (T1), 3 (T2), 5 (T3) y 10 (T4) g d⁻¹ de Sc (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech). La levadura se ofreció vía oral antes del primer horario de alimentación. Los carneros se alojaron en jaulas metabólicas individuales y alimentaron (5 % del peso vivo) con raciones similares a las 08:00 y 18:00 h, y agua *ad libitum*.

Los contenidos de proteína cruda (PC) y cenizas del alimento y Sc se determinaron en la muestra seca (MS) (AOAC, 2005). También se determinó fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) (Van Soest *et al.* 1991) y extracto etéreo (EE) (Nielsen, 2010) (Cuadro 1).

Toma de muestras

Para determinar la composición de ácidos grasos de cadena larga se tomaron 50 mL de fluido ruminal del saco ventral del rumen y 50 mL de contenido duodenal. Las muestras se tomaron cada 4 h por 12 h durante 3 d consecutivos. Las muestras de fluido ruminal y duodenal se vertieron en tubos Falcon®, se midió el pH con un potenciómetro portátil (Orion, USA), y se conservaron a -20 °C para su análisis posterior. El fluido ruminal y duodenal se vertió en viales de vidrio (120 mL) y se deshidrataron en una liofilizadora (Labconco, USA) 2 d a -50 °C y 0.1 psi. El deshidratado se pulverizó en un molino para café (Krupps, USA) y se almacenó en papel encerado a -20 °C hasta su análisis.

Nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles

Cuatro mL de fluido ruminal filtrado con cuatro capas de man-ta de cielo se vertieron en un tubo de polipropileno (16 mL) con 1 mL de ácido metafosfórico al 25 % (relación 4:1). Las muestras de fluido ruminal acidificado se centrifugaron a 20 000 g por 15 min. El sobrenadante se utilizó para medir la concentración de nitrógeno amoniacal por el método de fenol-hipoclorito (McCulloch, 1967) a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro Cary 1E (Varian, USA).

experimental protocol related to animal management and welfare was established based on the guidelines described in NOM-062-ZOO-1999. The experimental design was 4×4 cross-over. The rams were adapted to the diet for 10 d, and the ruminal and duodenal fluid samples were taken for 3 d. The diet included 80 % of Engorda Cordero Plus® and 20 % of alfalfa (*Medicago sativa*) hay. The treatments (T) were 0 (T1), 3 (T2), 5 (T3), and 10 (T4) g d⁻¹ of Sc (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech). The yeast was offered orally before the first feeding time. The rams were housed in individual metabolic cages and fed similar rations (5 % live weight) at 08:00 and 18:00 h, and water *ad libitum*.

The crude protein (PC), and ashes content of the food and Sc were determined from the dry sample (MS) (AOAC, 2005). Neutral detergent fiber (FDN), acid detergent fiber (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991), and ether extract (EE) (Nielsen, 2010) were determined as well (Table 1).

Sampling

To determine the composition of long-chain fatty acids, 50 mL of ruminal fluid were taken from the ventral rumen sac, and an equal amount was taken from the duodenal content. Samples were taken every 4 h per 12 h for 3 consecutive days. The ruminal and duodenal fluid samples were poured into Falcon® tubes; the pH was measured with a portable potentiometer (Orion, USA); and they were stored at -20 °C for further analysis. The ruminal and duodenal fluid was poured into glass vials (120 mL) and dehydrated in a lyophilizer (Labconco, USA) for 2 d at -50 °C and 0.1 psi. The dehydrated fluid was pulverized in a coffee mill (Krupps, USA) and wrapped with waxed paper, before it was stored at -20 °C until analysis.

Ammoniacal nitrogen and volatile fatty acids

Four mL of ruminal fluid filtered through four layers of gauze were poured into a polypropylene tube (16 mL) with 1 mL of 25 % metaphosphoric acid (4:1 ratio). The acidified ruminal fluid samples were centrifuged at 20 000 g for 15 min. The supernatant was used to measure the ammoniacal nitrogen concentration using the phenol-hypochlorite method (McCulloch, 1967), at a 630 nm of absorbance on a Cary 1E spectrophotometer (Varian, USA).

Volatile fatty acids (AGV) (Erwin *et al.*, 1961) were analyzed in 1 mL of the supernatant and in a gas chromatograph (HP 6890, USA). The detector had the following conditions: HP-FFAP 19091F-433 capillary column (Agilent, USA); 0.25 μm film; 30 m long and 0.25 mm wide; N as carrier gas; H to generate flame (33 mL min⁻¹ flow); air (330 mL min⁻¹) as auxiliary gas flow (14 mL min⁻¹); and 9.94 min for each analysis. The injector and detector temperature were 230 and 240 °C, respectively. The oven

Cuadro 1. Composición química del alimento (80 % de alimento balanceado Engorda Cordero Plus, 20 % de alfalfa achicalada y *Saccharomyces cerevisiae*[†]) para carneros.

Table 1. Chemical composition feed (80 % Engorda Cordero Plus balanced food, 20 % alfalfa hay, and *Saccharomyces cerevisiae*[†]) for rams.

Componente (%)	Alimento	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [†]
Materia seca	97.12	95.64
Humedad	2.87	4.36
Proteína cruda	18.66	28.40
FDN	36.88	30.18
FDA	31.65	17.15
Extracto etéreo	5.23	5.18
Cenizas	11.72	6.66
Metil ésteres de ácidos grasos		
Mirístico	0.31	0.20
Palmitico	18.72	17.32
Palmitoleico	0.37	1.54
Heptadecanoico	0.11	0.08
Estearico	1.85	3.05
Elaídico	0.58	0.14
Oleico	30.17	21.48
Linoleico	43.06	50.12
Araquídico	0.75	0.84
Linolénico	3.82	2.13

[†]Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech. FDN: fibra detergente neutro. FDA: fibra detergente acida.

❖ [†]Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech. FDN: neutral detergent fiber. FDA: acid detergent fiber.

Los ácidos grasos volátiles (AGV) (Erwin *et al.*, 1961) se analizaron en 1 mL del sobrenadante y en un cromatógrafo de gases (HP 6890, USA). Las condiciones del detector fueron: columna capilar HP-FFAP 19091F-433 (Agilent, USA), película de 0.25 μm , longitud de 30 m y diámetro de 0.25 mm, con N como gas acarreador, H para generar flama (flujo de 33 mL min⁻¹), aire (330 mL min⁻¹) como caudal de gas auxiliar (14 mL min⁻¹) y 9.94 min para cada análisis. La temperatura del inyector y detector fue 230 y 240 °C. Las condiciones del horno fueron: rampa 1, 65 °C min⁻¹, 95 °C y 0.15 min y rampa 2, 15 °C min⁻¹, 145 °C por 6 min. El estándar de ácidos grasos de cadena corta fue FAM6C (Supelco®, USA).

Metil ésteres de ácidos grasos

Los metil ésteres de los ácidos grasos del alimento, la levadura, el fluido ruminal y el duodenal se determinaron con las técnicas descritas por Palmquist y Jenkins (2003), Jenkins (2010) y Cesaro *et al.* (2013). En un tubo de polipropileno (16 mL) se vertieron 0.5 g de muestra y 2 mL de metóxido de sodio en metanol (0.5 M; Sigma®), se agitó en un vórtex (Labnet, USA), se mantuvo 10 min a 50 °C en baño María, se enfrió por 5 min y se adicionaron 3 mL de ácido clorhídrico metanólico (5 %; 1.37 M;

conditions were: 65 °C min⁻¹, 95 °C, for 0.15 min (ramp 1) and 15 °C min⁻¹, 145 °C, for 6 min (ramp 2). The short-chain fatty acid standard was FAM6C (Supelco®, USA).

Fatty acid methyl esters

The techniques described by Palmquist and Jenkins (2003), Jenkins (2010), and Cesaro *et al.* (2013) were used to determine the fatty acid methyl esters of the feed, the yeast, the rumen and duodenal fluid. Half a gram of the sample and 2 mL of sodium methoxide in methanol (0.5 M, Sigma®) were poured into a polypropylene tube (16 mL) and mixed in a vortex (Labnet, USA), maintained at 50 °C for 10 min in a water bath, and cooled for 5 min; finally, 3 mL of methanolic hydrochloric acid (5 %, 1.37 M, Sigma®) were added. The mixture was mixed in a vortex and maintained 12 min at 78 °C in a water bath. The sample was cooled for 7 min, before adding 3 mL of hexane (JT Baker®) and 5 mL of K₂CO₃ (6 %, 0.43 M, Merck®); the sample was then mixed in a vortex and centrifuged for 5 min at 2500 g in a refrigerated centrifuge (Beckman J2-HS; GMI, USA). The supernatant was transferred using a polypropylene tube (16 mL) with 0.5 g of sodium sulfate (Sigma®) and 0.1 g of activated carbon (J. T. Baker®). The sample was mixed in a

Sigma®), la mezcla se agitó en un vórtex y mantuvo 12 min a 78 °C en baño María. La muestra se enfrió por 7 min y se adicionaron 3 mL de hexano (J. T. Baker®) y 5 mL de K₂CO₃ (6 %; 0.43 M, Merck®), se agitó en un vórtex y centrifugó 5 min a 2500 g en una centrifuga refrigerada (Beckman J2-HS; GMI, USA). El sobrenadante se transfirió en un tubo de polipropileno (16 mL) con 0.5 g de sulfato de sodio (Sigma®) y 0.1 g de carbón activado (J. T. Baker®). La muestra se agitó en un vórtex y se centrifugó 5 min a 1500 g. La fase limpia de hexano se extrajo con microfiltros (17 mm-0.45 μm, Titan®) y se colocó en un vial para cromatografía (Thermo Scientific®).

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases (HP 6890, USA) con inyector automático (HP 7683, USA), charola con automuestreador, columna capilar Supelco SP® 2560 (USA) de 100 m×0.25 mm×0.2 μm (película) a 29 psi. Las condiciones del detector fueron: flujo de aire de 330 mL min⁻¹ y flujo de H de 33 mL min⁻¹ a 260 °C. Las condiciones del inyector (250 °C) fueron: He como gas acarreador, con caudal auxiliar de 18 mL min⁻¹ a 29 psi por 62 min. Las rampas de temperatura fueron: rampa 1, 1 °C min⁻¹, 140 °C por 2.95 min; rampa 2, 3 °C min⁻¹, 210 °C y rampa 3, 0.7 °C min⁻¹, 235 °C. Para la identificación de los tiempos de retención de los metil ésteres de los ácidos grasos se utilizaron los estándares FAME (Fatty Acid Methyl Esters) Mix C₄-C₂₄ de Supelco (49905-U), trans- 11-Vaccenic methyl ester de Supelco (18919-1AMP) y linoleic acid conjugated >90 % de Sigma-Aldrich.

Biohidrogenación ruminal

Para calcular el grado de biohidrogenación ruminal se utilizó la formula descrita por Wu *et al.* (1991):

$$\text{Biohidrogenación} = 100 - 100 \left[\frac{\left(\frac{\text{ácidos grasos C18 insaturados en fluido duodenal}}{\text{ácidos C18 totales en fluido duodenal}} \right)}{\left(\frac{\text{ácidos C18 insaturados en alimento consumido}}{\text{ácidos C18 totales en alimento consumido}} \right)} \right]$$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con PROC MIXED de SAS® (2013). El modelo estadístico incluyó el efecto fijo de los tratamientos y el tiempo. Las medias de tratamientos se separaron con la opción PDIF de LSMEANS. La biohidrogenación se analizó con el procedimiento PROC GLM de SAS® (2013). Los polinomios ortogonales se analizaron para probar el efecto lineal y cuadrático de los tratamientos y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997).

vortex and centrifuged for 5 min at 1500 g. The hexane-clean phase was extracted with micro-filters (17 mm-0.45 μm, Titan®) and placed in a chromatography vial (Thermo Scientific®).

The samples were analyzed using a gas chromatograph (HP 6890, USA) with an automatic injector (HP 7683, USA), an autosampler tray, and a Supelco SP® 2560 (USA) capillary column with a 100 m×0.25 mm×0.2 μm film at 29 psi. The detector's conditions were: 330 mL min⁻¹ air flow and 33 mL min⁻¹ H flow at 260 °C. The injector's conditions (250 °C) were: He as carrier gas, with an 18 mL min⁻¹ auxiliary flow at 29 psi for 62 min. The temperature ramps were: 1 °C min⁻¹, 140 °C for 2.95 min (ramp 1); 3 °C min⁻¹, 210 °C (ramp 2); and 0.7 °C min⁻¹, 235 °C (ramp 3). The standards used to identify the retention times of fatty acid methyl esters were: FAME (Fatty Acid Methyl Esters) Mix C₄-C₂₄ by Supelco (49905-U); trans-11-Vaccenic methyl ester by Supelco (18919-1AMP) and linoleic acid conjugated >90 % by Sigma-Aldrich.

Ruminal biohydrogenation

The formula described by Wu *et al.* (1991) was used to calculate the degree of ruminal biohydrogenation:

$$\text{Biohydrogenation} = 100 - 100 \left[\frac{\left(\frac{\text{C18 unsaturated fatty acids in duodenal fluid}}{\text{total C18 acids in duodenal fluid}} \right)}{\left(\frac{\text{C18 unsaturated acids in consumed feed}}{\text{total C18 acids in consumed feed}} \right)} \right]$$

Statistical analysis

The data were analyzed with PROC MIXED SAS® (2013). The statistical model included the fixed effect of treatments and time. The treatment's means were separated with the PDIF option of LSMEANS. The biohydrogenation was analyzed with the PROC GLM SAS® procedure (2013). The orthogonal polynomials were analyzed in order to test the linear and quadratic effect of treatments, and the means were compared using the Tukey test (Steel *et al.*, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Ruminal variables

Saccharomyces cerevisiae in the feed did not modify (p>0.05) neither the ruminal pH, the ammoniacal nitrogen (N-NH₃), nor AGV concentrations (Table 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables ruminales

Saccharomyces cerevisiae en el alimento no modificó ($p > 0.05$) el pH ruminal, nitrógeno amoniacal (N-NH₃) ni las concentraciones de AGV (Cuadro 2).

Los resultados de esta investigación contrastaron con los de Vyas *et al.* (2014); ellos argumentaron que el pH ruminal se estabilizó por efecto de Sc, pues estimula el crecimiento de bacterias consumidoras de ácido láctico, lo cual reduce la acumulación de lactato en rumen (Nisbet y Martin, 1991). Ahmed *et al.* (2015) señalaron que la presencia de vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos de Sc incrementan la fermentación del alimento y la producción de AGV. Las concentraciones de AGV no mostraron diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$; Cuadro 2). Los resultados fueron similares a los reportados por Malekhhahi *et al.* (2016) y Li *et al.* (2016), quienes complementaron el alimento con 10 y 14 g d⁻¹ de Sc.

La variación de resultados en las variables ruminales cuando el alimento se complementa con Sc está relacionada con el tipo de dieta, el huésped y los microorganismos ruminales (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). El pH y las concentraciones de AGV no se modificaron por la inclusión de Sc

The results of this research contrasted with the findings of Vyas *et al.* (2014) who argued that Sc stabilized ruminal pH, because Sc stimulates the growth of bacteria that consume lactic acid, reducing the accumulation of lactate in rumen (Nisbet and Martin, 1991). Ahmed *et al.* (2015) pointed out that the presence of vitamins, amino acids, and organic acids of Sc increase feed fermentation and AGV production. AGV concentrations did not show differences between treatments ($p > 0.05$, Table 2). The results were similar to those reported by Malekhhahi *et al.* (2016) and Li *et al.* (2016), who supplemented the feed with 10 and 14 g d⁻¹ of Sc, respectively.

The different results for the ruminal variables when the feed is complemented with Sc is related to type of diet, host, and ruminal microorganisms (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). The pH and AGV concentrations were not modified by the inclusion of Sc in the diet. The protein source of the diet exerts a buffering effect on pH changes, supporting the acid-base balance of the rumen (Gäbel *et al.*, 2016). This explains the buffering effect that dietary protein (18.7 %) has on acid production during fermentation in the rumen (Tripathi and Karim, 2011). Changes in ruminal pH are directly related to ammoniacal N concentrations in rumen (Martineau *et al.*, 2011). The decrease in ruminal

Cuadro 2. pH, nitrógeno amoniacal y concentración de ácidos grasos volátiles en fluido ruminal de carneros alimentados con una dieta complementada con *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 2. pH, ammoniacal nitrogen, and concentration of volatile fatty acids in the ruminal fluid of rams fed a diet complemented with *Saccharomyces cerevisiae*.

Variable	T1	T2	T3	T4	EEM	P	L	C
pH	5.917	5.868	5.950	6.075	0.043	0.408	0.808	0.683
N-NH ₃ [†]	28.544	26.278	23.825	26.217	0.925	0.384	0.272	0.228
Ácidos grasos volátiles								
Total (mM L ⁻¹)	77.143	77.748	74.811	75.477	1.987	0.959	0.693	0.995
Acético (%)	67.186	66.902	66.310	66.607	0.688	0.979	0.739	0.852
Propiónico (%)	15.842	15.702	17.035	17.269	0.533	0.680	0.285	0.871
Butírico (%)	14.205	14.656	13.964	13.298	0.365	0.660	0.338	0.479
Otros [§] (%)	2.767	2.740	2.691	2.826	0.100	0.980	0.897	0.722
Relación A:P [¶]	4.339	4.409	3.989	3.914	0.172	0.713	0.317	0.845

T1 a T4: tratamientos; T1: dieta base (80 % de alimento balanceado Engorda Cordero Plus[®] y 20 % de alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada), T2: dieta base+3 g d⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech; Sc), T3: dieta base+5 g d⁻¹ de Sc y T4: dieta base+10 g d⁻¹ de Sc. [†]Nitrógeno amoniacal. [¶]Relación acético: propiónico. [§]Representa la suma de ácido isobutírico, isovalérico y valérico. EEM: error estándar de la media. P: valor de p. L: efecto lineal. C: efecto cuadrático. ❖ T1 to T4: treatments; T1: basic diet (80 % of Engorda Cordero Plus[®] balanced feed and 20 % alfalfa (*Medicago sativa*) hay); T2: basic diet+3 g d⁻¹ of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech); T3: basic diet+5 g d⁻¹ of Sc; and T4: basic diet+10 g d⁻¹ of Sc. [†]Ammoniacal nitrogen. [¶]Acetic:propionic ratio. [§]Represents the sum of isobutyric, isovaleric and valeric acid. EEM: standard error of the mean. P: value of p. L: linear effect. C: quadratic effect.

en la dieta. La fuente proteica de la dieta ejerce efecto amortiguador de los cambios de pH, por lo que apoya el balance ácido-base del rumen (Gäbel *et al.*, 2016). Esto explica el efecto amortiguador de la proteína dietética (18.7 %) en la producción de ácidos durante la fermentación en el rumen (Tripathi y Karim, 2011). Los cambios en el pH ruminal se relacionan directamente con las concentraciones de N amoniacal en rumen (Martineau *et al.*, 2011). La disminución del pH ruminal y del N amoniacal indica consumo de este último por las bacterias del rumen (Røjen y Kristensen, 2012). Pero, la disminución de la concentración de N amoniacal con 3 y 5 g d⁻¹ de Sc no fue significativa (p=0.384) y el pH permaneció dentro del intervalo normal (5.5 y 6.5) para dietas altas en concentrado (Owens *et al.*, 1998).

Metil ésteres de ácidos grasos en fluido ruminal y duodenal y porcentaje de biohidrogenación

La composición de metil ésteres de ácidos grasos no mostró diferencias (p>0.05) (Cuadro 3) en fluido ruminal y duodenal de carneros alimentados con niveles crecientes de Sc (Cuadro 4). La concentración de ácido palmítico no fue diferente (p>0.05) entre tratamientos. Los niveles de ácido esteárico e isómeros intermediarios de la biohidrogenación (\sum C18:1 *trans*10/C18:1 *trans*11 y *cis*-9 *trans*-11 CLA: ácido ruménico) fueron similares (p>0.05) entre tratamientos cuando el pH ruminal fue mayor o igual a 5.6 (Cuadro 5). Esto indica que la biohidrogenación del ácido oleico, linoleico y linolénico es correcta.

Las dietas con contenidos altos de concentrado alimenticio se caracterizan por incrementar la fermentación ruminal, disminuir el pH e inhibir las bacterias celulolíticas para saturar los ácidos grasos insaturados. Fuentes *et al.* (2011) reportaron que el pH inferior a 5.6 promovió incremento de las concentraciones de ácido linoleico y ácido linolénico y redujo la del ácido esteárico. Este efecto no se observó en nuestro estudio porque las concentraciones de ácidos linoleico y linolénico fueron menores a la del esteárico; además, el pH ruminal entre tratamientos fue igual o superior a 5.6.

Doreau *et al.* (2016) y Tianzhang *et al.* (2016) señalaron que las diferencias en la biohidrogenación se relacionan con el tipo de ácidos grasos en la dieta

pH and ammoniacal N indicates that the latter is consumed by rumen bacteria (Røjen and Kristensen, 2012). However, the decrease in ammoniacal N concentration with 3 and 5 g d⁻¹ of Sc was not significant (p=0.384) and the pH remained within the normal range (5.5 and 6.5) for diets with high levels of concentrates (Owens *et al.*, 1998).

Fatty acid methyl esters in ruminal and duodenal fluid, and percentage of biohydrogenation

The composition of fatty acid methyl esters showed no differences (p>0.05) (Table 3) in the ruminal and duodenal fluid of rams fed with increasing levels of Sc (Table 4). The concentration of palmitic acid did not show differences (p>0.05) between treatments. The levels of stearic acid and intermediate isomers of the biohydrogenation (\sum C18:1 *trans*10/C18:1 *trans*11 and *cis*-9 *trans*-11 CLA: rumenic acid) were similar (p>0.05) between treatments when the ruminal pH was higher or equal to 5.6 (Table 5). Therefore, the biohydrogenation of oleic, linoleic, and linolenic acid is correct.

Diets with high contents of feed concentrates are set apart by an increase of the ruminal fermentation, a decrease of pH, and the inhibition of cellulolytic bacteria, saturating the unsaturated fatty acids. Fuentes *et al.* (2011) reported that less than 5.6 pH promoted the increase of linoleic and linolenic acids concentrations and reduced of the stearic acid concentration. This effect was not observed in our study because the of linoleic and linolenic acids concentrations were lower than that of stearic acid; in addition, the ruminal pH between treatments was equal or higher than 5.6.

Doreau *et al.* (2016) and Tianzhang *et al.* (2016) noted that the differences in biohydrogenation are related to the type of fatty acids in the diet, and that the effect that they have on the ruminal flora influences the fatty acids saturation. The high content of feed concentrate increases the content of trans fatty acids (Grinari and Bauman, 2006), as a result of the excess of free fatty acids that inhibit the final stage of biohydrogenation in which it turns into stearic acid (Váradyová *et al.*, 2007, Buccioni *et al.*, 2012). The stearic acid concentration in duodenal fluid was greater than 50 %, although the oleic and linoleic concentration in the diet was 30.17 and 43.06 % of the fat profile, respectively. Additionally,

Cuadro 3. Composición de ácidos grasos (porcentaje de metil ésteres de ácidos grasos) en el fluido ruminal de carneros alimentados con una dieta complementada con *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 3. Fatty acid composition (percentage of fatty acid methyl esters) in the ruminal fluid of rams fed a diet complemented with *Saccharomyces cerevisiae*.

Ácido graso	T1	T2	T3	T4	EEM	P	L	C
Láurico	0.186	0.199	0.237	0.233	0.020	0.791	0.365	0.845
Mirístico	1.148	0.982	1.203	1.176	0.055	0.532	0.559	0.549
Pentadecanoico	1.434	1.294	1.392	1.415	0.047	0.763	0.927	0.429
Palmitico	33.338	33.588	32.258	32.240	0.789	0.916	0.561	0.939
Palmitoleico	1.542	1.618	1.562	1.514	0.046	0.900	0.760	0.550
Heptadecanoico	0.371	0.364	0.345	0.375	0.013	0.880	0.959	0.532
Esteárico	20.114	20.534	22.011	22.956	1.127	0.830	0.376	0.916
∑ C18:1 <i>trans</i> 10 y C18:1 <i>trans</i> 11	8.857	8.858	8.631	8.664	0.372	0.995	0.831	0.984
Oleico	14.453	13.896	13.205	13.580	0.251	0.373	0.161	0.365
Linoleico	8.293	8.089	7.983	7.841	0.153	0.799	0.339	0.926
Araquídico	0.322	0.299	0.339	0.357	0.021	0.817	0.480	0.652
Linolénico	0.714	0.694	0.720	0.679	0.022	0.921	0.707	0.828
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.617	0.558	0.561	0.606	0.057	0.981	0.959	0.688
Otros [†]	8.090	8.328	8.940	7.963	0.170	0.179	0.871	0.075

T1 a T4: tratamientos; T1: dieta base (80 % de alimento balanceado Engorda Cordero Plus[®] y 20 % de alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada), T2: dieta base+3 g d⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech), T3: dieta base+5 g d⁻¹ de Sc y T4: dieta base +10 g d⁻¹ de Sc. CLA: ácido linoleico conjugado. EEM: error estándar de la media. P: valor de p. L: efecto lineal. C: efecto cuadrático. [†]Ésteres metílicos no identificados. ❖ T1 to T4: treatments; T1: basic diet (80 % of Engorda Cordero Plus[®] balanced feed and 20 % alfalfa (*Medicago sativa*) hay); T2: basic diet+3 g d⁻¹ of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech); T3: basic diet+5 g d⁻¹ of Sc; and T4: basic diet+10 g d⁻¹ of Sc. CLA: conjugated linoleic acid. EEM: standard error of the mean. P: value of p. L: linear effect. C: quadratic effect. [†]Unidentified methyl esters.

Cuadro 4. Composición de ácidos grasos (porcentaje de metil ésteres de ácidos grasos) en el fluido duodenal de carneros alimentados con una dieta complementada con *Saccharomyces cerevisiae*.

Table 4. Fatty acid composition (percentage of fatty acid methyl esters) in the duodenal fluid of rams fed a diet complemented with *Saccharomyces cerevisiae*.

Ácido graso	T1	T2	T3	T4	EEM	P	L	C
Mirístico	0.439	0.346	0.390	0.423	0.022	0.497	0.982	0.185
Pentadecanoico	0.650	0.608	0.647	0.695	0.025	0.723	0.480	0.412
Palmitico	17.479	17.584	17.726	17.835	0.169	0.907	0.477	0.994
Palmitoleico	0.273	0.273	0.301	0.315	0.010	0.390	0.113	0.738
Heptadecanoico	0.436	0.443	0.461	0.450	0.010	0.891	0.579	0.707
Esteárico	52.891	53.052	53.366	54.138	1.257	0.989	0.752	0.915
∑ C18:1 <i>trans</i> 10 y C18:1 <i>trans</i> 11	10.303	10.113	10.561	9.552	0.773	0.979	0.818	0.815
Oleico	6.251	6.064	5.899	5.837	0.244	0.947	0.569	0.910
Linoleico	4.419	4.499	4.061	4.282	0.231	0.932	0.715	0.892
Araquídico	0.690	0.710	0.709	0.708	0.009	0.853	0.543	0.586
Linolénico	0.451	0.460	0.445	0.435	0.030	0.994	0.838	0.889
C9T11 CLA	0.313	0.319	0.306	0.310	0.013	0.989	0.866	0.973
Otros [*]	5.404	5.403	5.127	5.022	0.185	0.871	0.445	0.899

T1 a T4; tratamientos; T1: dieta base (80 % de alimento balanceado Engorda Cordero Plus[®] y 20 % de alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada), T2: dieta base+3 g d⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech), T3: dieta base+5 g d⁻¹ de Sc y T4: dieta base+10 g d⁻¹ de Sc. CLA: ácido linoleico conjugado. EEM: error estándar de la media. P: valor de p. L: efecto lineal. C: efecto cuadrático. [†]Ésteres metílicos no identificados. ❖ T1 to T4: treatments; T1: basic diet (80 % of Engorda Cordero Plus[®] balanced feed and 20 % alfalfa (*Medicago sativa*) hay); T2: basic diet+3 g d⁻¹ of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech); T3: basic diet+5 g d⁻¹ of Sc; and T4: basic diet+10 g d⁻¹ of Sc. CLA: conjugated linoleic acid. EEM: standard error of the mean. P: value of p. L: linear effect. C: quadratic effect. [†]Unidentified methyl esters.

Cuadro 5. Biohidrogenación ruminal de ácidos grasos de cadena larga (%) en carneros alimentados con una dieta complementada con *Saccharomyces cerevisiae*.
Table 5. Ruminal biohydrogenation of long-chain fatty acids (%) in rams fed a diet complemented with *Saccharomyces cerevisiae*.

Ácido graso	T1	T2	T3	T4	EEM	P	L	C
Oleico	80.038	79.892	80.892	81.034	0.808	0.955	0.626	0.937
Linoleico	90.267	89.604	90.919	90.506	0.535	0.878	0.703	0.916
Linolénico	88.605	87.886	88.650	88.835	0.763	0.979	0.849	0.793
Total	66.313	66.324	67.552	64.415	1.573	0.934	0.778	0.657

T1 a T4: tratamientos; T1: dieta base (80 % de alimento balanceado Engorda Cordero Plus[®] y 20 % de alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada), T2: dieta base+3 g d⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech), T3: dieta base+5 g d⁻¹ de Sc y T4: dieta base+10 g d⁻¹ de Sc. EEM: error estándar de la media. P: valor de p. L: efecto lineal. C: efecto cuadrático. ❖ T1 to T4: treatments; T1: basic diet (80 % of Engorda Cordero Plus[®] balanced feed and 20 % alfalfa (*Medicago sativa*) hay); T2: basic diet+3 g d⁻¹ of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Yea Sacc¹⁰²⁶, Alltech); T3: basic diet+5 g d⁻¹ of Sc; and T4: basic diet+10 g d⁻¹ of Sc. EEM: standard error of the mean. P: value of p. L: linear effect. C: quadratic effect.

y el efecto que ejercen en la flora ruminal influyen en la saturación de los ácidos grasos. El contenido alto de concentrado alimenticio incrementa el contenido de ácidos grasos *trans* (Griinari y Bauman, 2006) por el exceso de ácidos grasos libres que inhiben la biohidrogenación final a esteárico (Váradyová *et al.*, 2007; Buccioni *et al.*, 2012). La concentración de ácido esteárico en fluido duodenal fue mayor a 50 %, aunque la de oleico y linoleico en la dieta fue 30.17 y 43.06 % del perfil graso. Además, los porcentajes de biohidrogenación (Cuadro 5) fueron superiores a los señalados por Doreau y Ferlay (1994) para dietas altas en concentrado. *Saccharomyces cerevisiae* no modificó la biohidrogenación ruminal aunque el aporte de ácido linoleico en la levadura fue 50 % del perfil graso. El ácido linoleico es un inhibidor de la actividad de las principales especies involucradas en la biohidrogenación, como las relacionadas con el género *Butyrivibrio* (Maia *et al.*, 2010). Fuentes *et al.* (2009) indicaron que concentraciones altas de oleico, linoleico y linolénico en fluido ruminal disminuyen la biohidrogenación; pero, las concentraciones de estos ácidos grasos aportadas en la dieta y Sc (5 %) no modificaron las concentraciones de ácidos grasos e intermediarios de la BH ruminal (Ratledge y Evans, 1989; Bayat *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

La complementación de hasta 10 g d⁻¹ con Sc en carneros alimentados con un concentrado comercial no modificó el proceso de biohidrogenación ruminal.

the biohydrogenation percentages (Table 5) were higher than those indicated by Doreau and Ferlay (1994) for diets with high levels of concentrates. *Saccharomyces cerevisiae* did not modify the ruminal biohydrogenation, although the contribution of linoleic acid in the yeast accounted for 50 % of the fat profile. Linoleic acid inhibits the activity of the main species involved in biohydrogenation, such as those that belong to the *Butyrivibrio* genus (Maia *et al.*, 2010). Fuentes *et al.* (2009) indicated that high concentrations of oleic, linoleic, and linolenic acids in ruminal fluid decrease biohydrogenation; however, the concentrations of these fatty acids contributed by the diet and Sc (5 %) did not modify the concentrations of fatty acids and intermediaries of the ruminal BH (Ratledge and Evans, 1989, Bayat *et al.*, 2015).

CONCLUSION

The complementation of up to 10 g d⁻¹ with Sc in rams fed with a commercial concentrate did not modify the ruminal biohydrogenation process.

—End of the English version—



LITERATURA CITADA

AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005. 18th edition. USA. 176 p.

- Ahmed, M. H., M. M. Y. Elghandour, A. Z. M. Salem, H. S. Zeweil, A. E. Kholif, A. V. Klieve, and A. M. A. A. Abdelrassol. 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180: 90-97.
- Alves, P. S., A. Francisco, M. Costa, J. Santos-Silva, and R. J. B. Bessa. 2017. Biohydrogenation patterns in digestive contents and plasma of lambs fed increasing levels of a tanniferous bush (*Cistus ladanifer* L.) and vegetable oils. *Anim. Feed Sci. Technol.* 225: 157-172.
- Apás, A. L., E. Arena M., S. Colombo, and N. González S. 2015. Probiotic administration modifies the milk fatty acid profile, intestinal morphology, and intestinal fatty acid profile of goats. *J. Dairy Sci.* 98: 47-54.
- Ballin, N. Z. 2010. Review: Authentication of meat and meat products. *Meat Sci.* 86: 577-587.
- Bayat, A. T., P. Kairenius, T. Stefanski, H. Leskinen, S. Comtet-Marre, E. Forano, F. Chaucheryas-Durand, and J. Shingfield K. 2015. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *J. Dairy Sci.* 98: 3166-3181.
- Buccioni, A., M. Decandia, S. Minieria, G. Molle, and A. Cabiddu. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174: 1-25.
- Castro-Hernández, H., F. F. González-Martínez, I. A. Domínguez-Vara, J. M. Pinos-Rodríguez, E. Morales-Almaráz, y R. Veyra-Alberto. 2014. Efecto del nivel de concentrado sobre el perfil de ácidos grasos de la leche de vacas Holstein en pastoreo. *Agrociencia* 48: 765-775.
- Cesaro, G., F. Tagliapietra, L. Grigoletto, A. Cecchinato, D. Dannenberger, G. Bittante, and S. Schiavon. 2013. Fecal sample preparation methods for gas chromatography analysis of fatty acids of ruminants fed different amounts of rumen protected conjugated linoleic acids (CLA). *Anim. Feed Sci. Technol.* 183: 184-194.
- Chaucheryas-Durand, F., D. Walker N., and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeast on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 5-26.
- Cruz-González, M. I., I. D. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, A. J. Munguia-Xochihua, M. R. Molina-Barrios, F. Rivera-Acuña, y F. J. Hernández-Chávez. 2014. Caracterización del perfil de ácidos grasos en carne de borrego de engorda utilizando cromatografía de gases. *Nacameh* 8: 39-49.
- Doreau, M., and A. Ferlay. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45: 379-396.
- Doreau, M., A. Meynadier, V. Fievez, A. Ferlay. 2016. Chapter 19. Ruminal metabolism of fatty acids: Modulation of polyunsaturated, conjugated, and *trans* fatty acids in meat and milk. *In: Handbook of Lipids in Human Function.* Elsevier Inc. pp: 521-542.
- Erwin, E. S., J. Marco G., and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1776.
- FAO. 2010. Fats and Fatty Acids in Human Nutrition (FAO report of an expert consultation). Vol. 91, Rome: FAO. 166 p.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, W. Cardozo P., and B. Vlaeminck. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 92: 4456-4466.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, V. Fievez, M. Blanch, and D. Mercadal. 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169: 35-45.
- Gäbel, G., J. R. Aschenbach, and R. Rackwitz. 2016. Sauer ist nicht immer lustig: Kann sich der Vormagen gegen die Säurebelastung verteidigen? *In: 8. Leipziger Tierärztekongress Teil: Tagungsband 3., Wiederkäuer, Schweine, Nutzgeflügel, Fische, DVG-Symposium, Bienen, Veterinary Public Health, Recht und Beruf.* J. R. Aschenbach, ed. Lehmanns Media GmbH, Berlin, Germany.
- Geerken, C. M., D. Calzadilla, and R. González. 1987. Aplicación de la técnica de dos marcadores para medir el consumo de pasto y la digestibilidad de la ración de vacas de pastoreo suplementadas con concentrado. *Pastos Forrajes* 10: 266-273.
- Griinari, J. M., and E. Bauman D. 2006. Milk fat depression: concepts, mechanism and management application. *In: Ruminant Physiology Digestion, Metabolism and Impact Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress.* Wageningen Academic Publishers, Amsterdam. 591 p.
- Hodgson, J. M., L. Wahlqvist M., A. Boxall J., and D. Balazs N. 1996. Platelet *trans* fatty acids in relation to angiographically assessed coronary artery disease. *Atherosclerosis* 120: 147-154.
- Ishlak, A., M. Günal, and A. AbuGhazaleh A. 2015. The effects of cinnamaldehyde, monensin and quebracho condensed tannin on rumen fermentation, biohydrogenation and bacteria in continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207: 31-40.
- Jenkins, T. C. 2010. Technical note: Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. *J. Dairy Sci.* 93: 1170-1174.
- Jurkovich, V., E. Brydl, J. Kutasi, A. Harnos, P. Kovács, L. Könyves, Z. Muravölgyi, and H. Fébel. 2014. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains on the rumen fermentation in sheep fed with diets of different forage to concentrate ratios. *J. Appl. Anim. Res.* 42: 481-486.
- Li, S., I. Yoon, M. Scott, E. Khafipour, C. Plaizier J. 2016. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and subacute ruminal acidosis on production, inflammation, and fermentation in the rumen and hindgut of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 211: 50-60.
- Maia, M. R. G., C. L. Chaudhary, S. C. Bestwick, J. A. Richardson, N. McKain, R. T. Larson, A. I. Graham, and J. R. Wallace. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology* 10: 52-62.
- Malekkhahi, M., M. Tahmasbi A., A. Naserian A., M. Danesh-Mesgaran, J. L. Kleen, O. AlZahal, and M.H. Ghaffari. 2016. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 213: 29-43
- Martineau, R., D. Sauvant, R. D. Ouellet, C. Côrtes, J. Vernet, I. M. Ortigues, and H. Lapierre. 2011. Relation of net portal

- flux of nitrogen compounds with dietary characteristics in ruminants: A meta-analysis approach. *J. Dairy Sci.* 94: 2986-3001.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 17: 297-304.
- Nielsen, S. 2010. *Food Analysis Laboratory Manual*, (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York). 177 p.
- Nisbet, D., J., and A. S. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69: 4628-4633.
- NOM-062-ZOO. 1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> (Consulta: enero 2017).
- Owens, F. N., S. D. Secrist, J. W. Hill, R. D. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.
- Palmquist, D. L., and C. T. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81: 3250-3254.
- Ratledge, C., and T. C. Evans. 1989. *Lipids and their Metabolism*, (Academic Press, London). 455 p.
- Røjen, B. A., and B. N. Kristensen. 2012. Effect of time duration of ruminal urea infusions on ruminal ammonia concentrations and portal-drained visceral extraction of arterial urea-N in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 95: 1395-1409.
- SAS. Institute Inc. 2013. *Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC.*
- Steel, R. G. D., H. J. Torrie, and A. D. Dickey. 1997. *Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach*. 3rd edition. McGraw-Hill Co. Inc. New York. 666 p.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, D. M. Stern, G. J. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 124: 261-265.
- Tianzhang, Z., M. Yong, Q. Yanghua, L. Hailing, L. Kun, Z. Zhaoyun, and L. Xiaonan. 2016. Effect of dietary oil sources on fatty acid composition of ruminal digesta and populations of specific bacteria involved in hydrogenation of 18-carbon unsaturated fatty acid in finishing lambs. *Small Rumin. Res.* 144: 126-134.
- Titi, H. H., O. R. Dmour, and Y. A. Abdullah. 2008. Growth performance and carcass characteristics of Awassi lambs and Shami goat kids fed yeast culture in their finishing diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142: 33-44.
- Tripathi, M. K., and A. S. Karim. 2011. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livest. Sci.* 135: 17-25.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Váradyová, Z., S. Kisidayová, P. Siroka, and D. Jalc. 2007. Fatty acid profiles of rumen fluid from sheep fed diets supplemented with various oils and effect on the rumen ciliate population. *Czech J. Anim. Sci.* 52: 399-406.
- Vyas, D., A. Uwizeye, Z. W. Yang, and A. K. Beauchemin. 2014. Importance of yeast viability for reducing the effects of ruminal acidosis in beef heifers during and following an imposed acidosis challenge. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:103-113.
- Wu, Z., A. O. Ohajuruka, and L. D. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty-acids by dairy-cows. *J. Dairy Sci.* 74: 3025-3034.