Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterianarias

EVALUACIÓN DEL ORUJO DE UVA PAIS COMO MODULADOR DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN DIETAS PARA RUMIANTES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Veterinarias para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

SANDRA TATIANA SUESCUN OSPINA

CHILLAN-CHILE

2023

Profesor Guía: Dr. Jorge Eduardo Ávila Stagno
Depto. de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Profesor Co-guía: Dr. Julio Alarcón Enos
Depto. de Ciencias Básicas
Universidad del Bio-Bío

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor guía:

Jorge Ávila Stagno

Med. Vet., MSc., PhD

Profesor Co-guía:

Julio Alarcón Enos

Q. F., MSc., PhD

Comisión evaluadora:

Pamela Williams Salinas

Ing. Agr., Dr. Cs.

Gustavo Jaurena

Ing. Agr., MSc., PhD

Rodrigo Allende Vargas

M.V. MSc

Director de programa:

Fidel Castro Reboredo

Ing. Zootec., MSc., PhD

AGRADECIMIENTOS

Realizar este doctorado ha sido una experiencia que me ha cambiado la vida y no habría sido posible sin el cariño, apoyo y orientación que he recibido de muchas personas. En primer lugar, me gustaría expresar mi sincera gratitud a mi profesor guía, Dr. Jorge Avila, por su paciencia, orientación, motivación y su calidez. No podría haber imaginado tener un mejor profesor guía para mis estudios doctorales. Igualmente, me gustaría dar las gracias a mi profesor co-guía, el Dr. Julio Alarcón (Universidad del Biobío), por su gran apoyo y amables consejos que fueron fundamentales a la hora de explorar nuevas ideas. Me gustaría también dar las gracias a la Dra. Pamela Williams (Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía), al profesor Rodrigo Allende (Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Veterinaria), así como al profesor Gustavo Jaurena (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), miembros de mi comisión doctoral por haber compartido sus conocimientos, que influyeron de manera substancial en el trabajo y apoyaron las diferentes presentaciones de avance de resultados. Mi más sincero agradecimiento también al profesor Fidel Ovidio Castro que me apoyo para la ejecución de actividades experimentales y dio acceso a las instalaciones del laboratorio de Biotecnología animal. Sin su valioso apoyo no sería posible llevar a cabo algunos apartados de esta tesis. Me gustaría agradecer a Janicia Venegas (Químico analista, laboratorio de Nutrición Animal) que me enseño y apoyó con los análisis químicos, pero además hizo agradable y cálido el proceso de aprendizaje.

También agradezco a todo el personal académico del Departamento de Ciencia Animal por el cariño, estímulo y apoyo durante todo mi período de estudio. Estaré siempre agradecida con Nelson Vera Aguilera y Rita Astudillo no solo por la ayuda que me prestaron desde la recogida y procesamiento del orujo, todo el trabajo de laboratorio, y el análisis de resultados. También por su amistad y cariño durante estos años, que hicieron junto con Francisca Cordero y Francisca Matamala que esta fuera una época que recordaré con amor toda mi vida. A mi compañero de doctorado Yat Zen Wong gracias por su amistad, enseñanzas y apoyo.

Agradezco muy especialmente a mi hermano y su familia, porque me han dado el apoyo moral, el ánimo y la motivación suficientes para alcanzar todas mis metas personales. El mayor reconocimiento se lo debo a mi madre Adiela y a mi hija Abril que son el motor de mi vida y han emprendido junto a mi cada aventura, para ustedes infinitas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS……. iii
TABLA DE CONTENIDO…… v
LISTA DE TABLAS……. vii
LISTA DE FIGURAS…… x
ABREVIACIONES…… xii
RESUMEN……..... xv
INTRODUCCIÓN GENERAL…….. 1
OBJETIVO GENERAL…….. 8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS……. 8
CAPITULO 1 REVISIÓN DE LITERATURA……. 10
1.1 INTRODUCCIÓN……..…….……. 10
1.2 ORUJO DE UVA……..…… 15
1.2.1 Composición química y valor nutricional del orujo de uva…….. 17
1.3 USO DE ORUJO DE UVA EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES…… 28
1.3.1 Potencial antimetanogénico del orujo de uva…… 32
1.3.2 Orujo de uva y metabolismo del nitrógeno…… 35
1.4 EFECTOS DEL ORUJO DE UVA SOBRE LA SALUD ANIMAL…… 37
1.5 EFECTOS DEL ORUJO DE UVA SOBRE LA CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL 38
1.6 UVA VARIEDAD PAÍS…… 39
1.7 ESTRATEGIAS DE VALORIZACIÓN DEL ORUJO DE UVA……. 41
CAPITULO 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA, PERFIL LIPÍDICO, PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL DEL ORUJO DE UVA PAÍS Y SU EXTRACTO POLIFENÓLICO ESTANDARIZADO... 43
2.1 EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE SECADO DE ORUJO DE UVA PAÍS (*VITIS VINIFERA* L.) SOBRE LOS CONTENIDOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO EN CONDICIONES *IN VITRO*…… 44
2.2 EXTRACCION ASISTIDA POR MICROONDAS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORUJO DE UVA PAÍS……..... 70
CAPITULO 3. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO DE OU PAÍS COMO INGREDIENTE DE DIETAS PARA RUMIANTES SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACION RUMINAL, PRODUCCIÓN DE CH_4, Y POBLACIONES MICROBIANAS *IN VITRO*…… 94
3.1 EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA PAÍS EN DIETAS CON ALTO Y BAJO CONTENIDO DE FORRAJE: FERMENTACIÓN RUMINAL, PRODUCCIÓN DE METANO Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES…… 95
3.2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE FUENTES FIBROSAS POR ORUJO DE UVA PAÍS EN DIETAS PARA RUMIANTES: EFECTOS SOBRE LA DESAPARICION DE NUTRIENTES, PRODUCCIÓN DE METANO Y LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN FERMENTADORES RUSITEC…… 121
CAPITULO 4. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN EXTRACTO POLIFENOLICO DE ORUJO DE UVA PAIS SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*……..... 147

4.1 EFECTOS DE DOSIS CRECIENTES DE UN EXTRACTO POLIFENOLICO DE ORUJO DE UVA PAÍS SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL, PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIONES MICROBIANAS EN UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN RUMINAL RUSITEC……..…… 148
4.2 EFECTOS DE LA COMBINACION DE UN EXTRACTO POLIFENÓLICO Y ACEITE DE ORUJO DE UVA PAÍS SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN, PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIONES MICROBIANAS *IN VITRO*…… 173
DISCUSIÓN GENERAL……..... 198
CONCLUSION GENERAL…… 210
FUTURAS INVESTIGACIONES…… 211
REFERENCIAS…….. 213
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES QUE SE HAN GENERADO DE ESTE TRABAJO……..... 244
PUBLICACIONES..... 244
PRESENTACIONES..... 245

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ORUJO DE UVA (% DE LA MATERIA SECA). 19
TABLA 1.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ORUJO DE UVA..... 23
TABLA 1.3 CONTENIDOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS DE VITIVINICULTURA 25
TABLA 1.4 PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ORUJO DE UVA 27
TABLA 1.5. EFECTOS LA INCORPORACIÓN DE ORUJO DE UVA A DIETAS DE RUMIANTES EN ENSAYOS REALIZADOS ENTRE 2012-2022. 30
TABLA 1.6. POTENCIAL ANTIMETANOGÉNICO DEL ORUJO DE UVA..... 34
TABLA 2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA, COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL ORUJO DE UVA PAÍS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE SECADO (G/KG MS SI NO SE INDICA ALGO DIFERENTE) 58
TABLA 2.1.2. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE SECADO DEL OU PAÍS SOBRE LOS PARÁMETROS DE LA CINÉTICA Y LA DESAPARICIÓN I*N VITRO* DE LA MATERIA SECA (DIVMS) A LAS 48 H DE INCUBACIÓN..... 60
TABLA 2.1.3. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE SECADO DE OU PAÍS SOBRE LA CINÉTICA Y PRODUCCIÓN DE GAS, CH_4 Y RENDIMIENTO DE CH_4 A LAS 48 H DE FERMENTACIÓN *IN VITRO*..... 61
TABLA 2.1.4. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE SECADO DEL OU PAÍS SOBRE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* A LAS 48 H DE INCUBACIÓN..... 62
TABLA 2.2.1. FACTORES Y NIVELES EVALUADOS EN LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS 78
TABLA 2.2.2. RENDIMIENTOS, CONTENIDOS DE POLIFENOLES, PROANTOCIANIDINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE OU PAÍS OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO CONVENCIONAL..... 84
TABLA 2.2.3. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SOBRE RENDIMIENTO, CONTENIDO DE POLIFENOLES, PROANTOCIANIDINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO DE OU PAÍS OBTENIDO POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.... 85
TABLA 2.2.4. REPETIBILIDAD Y ERROR DE MEDIDA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS. 89
TABLA 2.2.5. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OU PAÍS OBTENIDO POR EL SISTEMA SOXLETH..... 92
TABLA 3.1.1 INGREDIENTES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA (%MS SI NO SE INDICA ALGO DISTINTO) DE DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE SUPLEMENTADAS CON ORUJO DE UVA (OU) PAÍS A CONCENTRACIONES DE 0, 10% AND 20% (BASE MS).. 101
TABLA 3.1.2. PARÁMETROS DE LA CINÉTICA DE DESAPARICIÓN *IN VITRO* DE LA MATERIA SECA (DIVMS), LA PRODUCCIÓN DE GAS Y CH_4 DE DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE CON INCLUSIÓN DE OU PAÍS AL 0, 10% AND 20% (BASE MS) A 24 H DE INCUBACIÓN..... 107

TABLA 3.1.3. PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE CON INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA PAÍS A 0, 10% AND 20% (BASE MS) A LAS 24 H DE INCUBACIÓN. 111
TABLA 3.1.4. PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO *IN VITRO* DE DIETAS ALTA (AF) Y BAJA (BF) EN FORRAJE CON INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA PAÍS A 0, 10% AND 20% (MS) A LAS 24 H DE INCUBACIÓN. 112
TABLA 3.1.5. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON (R) ENTRE LOS COMPONENTES QUÍMICOS Y LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL DEL TRATAMIENTO INCUBADO 114
TABLA 3.2.1 INGREDIENTES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA (G/KG MS SI NO SE INDICA ALGO DISTINTO) DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES INCUBADAS EN FERMENTADORES RUSITEC 126
TABLA 3.2.2. PRIMERS USADOS EN EL ENSAYO QPCR 131
TABLA 3.2.3. DESAPARICIÓN DE NUTRIENTES (% MS) Y PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL DE DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE, Y TRATAMIENTOS CON ORUJO DE UVA (OU, 20% BASE MS) EN FERMENTADORES RUSITEC 134
TABLA 3.2.4. PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO (CH_4) EN DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE Y TRATAMIENTOS CON ORUJO DE UVA (OU, 20% BASE MS) EN FERMENTADORES RUSITEC 135
TABLA 3.2.5. CAMBIOS EN EL DNA DE BACTERIAS Y HONGOS TOTALES (LOG_{10} CONCENTRACIÓN DE ADN [NG/G MS]) EN MUESTRAS SÓLIDAS (SAM) Y LÍQUIDAS (LAM) DE FERMENTADORES RUSITEC, ALIMENTADOS CON DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE Y TRATAMIENTOS CON ORUJO DE UVA (OU) PAÍS. 137
TABLA 3.2.6. ABUNDANCIA RELATIVA (% DE BACTERIAS TOTALES) DE LOS MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN MUESTRAS SÓLIDAS Y LÍQUIDAS DE FERMENTADORES RUSITEC ALIMENTADOS CON DIETAS ALTAS Y BAJAS EN FORRAJE, SIN (AF, BF) Y CON INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA PAÍS (AFOU, BFOU) 139
TABLA 4.1.1. INGREDIENTES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA (G/KG MS SI NO SE ESPECIFICA ALGO DISTINTO) DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES INCUBADAS EN FERMENTADORES RUSITEC 153
TABLA 4.1.3. EFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE ORUJO DE UVA PAÍS (EOU) SOBRE LA DESAPARICIÓN DE NUTRIENTES Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE UNA DIETA ALTA EN FORRAJE EN FERMENTADORES RUSITEC 158
TABLA 4.1.4. EFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE ORUJO DE UVA PAÍS (EOU) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO (CH_4) DE UNA DIETA ALTA EN FORRAJE EN FERMENTADORES RUSITEC. 159
TABLA 4.1.5. EFECTOS DE UN EXTRACTO DE ORUJO DE UVA PAÍS (EOU) SOBRE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS Y HONGOS TOTALES (LOG_{10} CONCENTRACIÓN DE ADN (NG/G MS)) EN MUESTRAS SÓLIDAS (SAM) Y LÍQUIDAS (LAM) DE FERMENTADORES RUSITEC 160
TABLA 4.1.6. EFECTOS DE DOSIS CRECIENTES DE UN EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (EOU) SOBRE LA ABUNDANCIA RELATIVA (% DE BACTERIAS TOTALES) DEL ADN DE

METANÓGENOS TOTALES Y PRINCIPALES BACTERIAS FIBROLÍTICAS EN MUESTRAS EN MUESTRAS SÓLIDAS (SAM) Y LÍQUIDAS (LAM) DE FERMENTADORES RUSITEC..... 163
TABLA 4.2.1. INGREDIENTES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA (%MS SI NO SE INDICA ALGO DISTINTO) DE LOS SUSTRATOS INCUBADOS 179
TABLA 4.2.2. EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE Y EXTRACTO DE ORUJO DE UVA PAÍS SOBRE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE UNA DIETA ALTA EN FORRAJE A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN EN UN CULTIVO *BATCH* 185
TABLA 4.2.3. EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE ORUJO DE UVA Y EXTRACTO DE ORUJO DE UVA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO DE UNA DIETA ALTA EN FORRAJE A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN EN UN CULTIVO TIPO *BATCH* 186
TABLA 4.2.4. EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE Y EXTRACTO DE OU PAÍS SOBRE ABUNDANCIA ABSOLUTA DE BACTERIAS TOTALES Y HONGOS TOTALES (NG ADN/G MS), DE UNA DIETA ALTA EN FORRAJE A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN EN UN CULTIVO *BATCH* 187

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. ESTRUCTURA DE ESTA TESIS 7
FIGURA 2.1.1. RELACIONES ENTRE LA PRODUCCIÓN DE CH_4 (MG/G MS DESAPARECIDA) A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN Y LOS CONTENIDOS DE EXTRACTO ETÉREO (G/KG MS) (A), CENIZAS (G/KG MS) (B) CPT (G/KG MS) (C) Y PA(G/G MS) (D) DE OU PAÍS. CH_4 (•), RESPUESTA PREDICHA (—) 63
GRÁFICA 2.2.1. RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (CPT), PROANTOCIANIDINAS (PAC) Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE OU PAÍS OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO (S-L) CONVENCIONAL Y ASISTIDA POR MICROONDAS (EAM). (┌─*─┐) $P<0.05$ 90
FIGURA 2.2.1. CROMATOGRAMA DE HPLC DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS FENÓLICOS PRIMARIOS DE UN EXTRACTO DE OU PAÍS 91
FIGURA 3.1.1 INTERACCIÓN DIETA × OU EN DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE PARA (A) PRODUCCIÓN ASINTÓTICA DE GAS (ML/MS) Y (B) PRODUCCIÓN TOTAL DE GAS A LAS 24 H. VALORES DE MEDIA ENTRE SUSTRATOS CON LETRAS DIFERENTES DIFIEREN ($P<0.05$) 108
FIGURA 3.2.2. INTERACCIÓN DIETA × OU EN DIETAS ALTAS (AF) Y BAJAS (BF) EN FORRAJE PARA (A) PROPORCIÓN MOLAR DE PROPIONATO (%), (B) RELACIÓN A:P, Y (C) PROPORCIÓN MOLAR DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES DE CADENA RAMIFICADA (AGCR) (%), A LAS 24 H. LOS VALORES MEDIOS DENTRO DEL SUSTRATO SIN LETRAS COMUNES DIFIEREN ($P<0.05$) 110
FIGURA 4.1.1 HEATMAP DE LA ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL, RENDIMIENTO DE CH_4, LOS CONTENIDOS DE TANINOS CONDENSADOS DE LA DIETA Y LAS CONCENTRACIONES DE ADN (NG/G MS) DE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS TOTALES Y HONGOS TOTALES, CON BASE EN LA PUNTUACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON (R). CORRELACIONES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICANTES ($P<0.05$) SON INDICADAS CON UN * 166
FIGURA 4.2.1 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NÚMEROS DE COPIAS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS, DE SUSTRATOS CON EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (EOU) Y ACEITE DE ORUJO DE UVA (AOU) COMPARADOS CON LA DIETA CONTROL A LAS 24 H DE INCUBACIÓN. LOS FOLD-CHANGE PARA GRUPOS ESPECÍFICOS DE AMPLICONES SE CALCULARON COMO LA RELACIÓN (LOG 2) DEL NÚMERO DE COPIAS NORMALIZADO. VALOR DE $P < 0.05$ (*). 189
FIGURA 4.2.2 HEATMAP DE LA ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL, RENDIMIENTO DE CH_4, LOS CONTENIDOS DE EE Y FDN DE LOS SUSTRATOS, LAS POBLACIONES DE BACTERIAS TOTALES, HONGOS TOTALES, METANÓGENOS TOTALES Y BACTERIAS RUMINALES; CON BASE EN LA PUNTUACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON (R). CORRELACIONES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICANTES ($P<0.05$ Y $P<0.01$) SON INDICADAS CON * Y **. 190

FIGURA 5.1. EFECTOS DEL ACEITE Y EXTRACTO POLIFENÓLICO DE OU PAÍS SOBRE LOS MICROORGANISMOS VINCULADOS A LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y LA METANOGÉNESIS (ELABORACIÓN PROPIA) 208

ABREVIACIONES

AA	Aminoácidos
AG	Ácidos grasos
AGCR	Ácidos grasos de cadena ramificada
AGV	Ácidos grasos de cadena corta
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AOU	Aceite de orujo de uva
BH	Biohidrogenación
CC	Cambio climático
CG	Cromatografía de gases
CH_4	Metano
CLA	Acido linoleico conjugado
CO_2-eq	Dióxido de carbono equivalente
DIVMS	Desaparición *in vitro* de la materia seca
DMAC	4-dimetilaminocinamaldehido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EB	Energía bruta
ED	Energía digestible
EE	Extracto etéreo

EM	Energía metabolizable
EOU	Extracto polifenólico de orujo de uva
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
FID	detector de ionización de flama
GAE	Acido gálico equivalente
Gt	Gigatoneladas
GEI	Gases de efecto invernadero
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IPCC	Panel intergubernamental de cambio climático
LAD	Lignina ácido resistente
MJ	Mega joules
MMt	Millones de toneladas
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
MSD	Materia seca desaparecida
MSI	Materia seca incubada
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
$N\text{-}NH_3$	Nitrógeno amoniacal
N_2O	Oxido nitroso
OU	Orujo de uva
PA	Proantocianidinas

PC	Proteína cruda
PP	Polifenoles
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
CAT	Contenidos de antocianos totales
TC	Taninos condensados
TCD	Detector de conductividad térmica
TMR	Ración totalmente mezclada
CPT	Contenido de polifenoles totales
Trolox	Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

RESUMEN

La producción animal es esencial para satisfacer las demandas de proteína de alta calidad de una población creciente. Sin embargo, las emisiones de metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O) generadas en varias etapas del proceso productivo, reducen la eficiencia energética y son perjudiciales para el medio ambiente. Los subproductos agroindustriales como el orujo de uva son una fuente alternativa de fibra, proteínas y lípidos de alta digestibilidad con potencial para la alimentación animal, además de ser fuente de compuestos bioactivos, como polifenoles y grasas, que pueden ejercer efectos positivos en el rendimiento productivo, la composición nutricional de los productos finales, la excreción de nitrógeno y las emisiones de CH_4. Se realizaron seis estudios con el objetivo de evaluar los efectos de uso del OU País y de un extracto polifenólico estandarizado de orujo de uva (OU) País, en dietas para rumiantes utilizando los sistemas de fermentación *in vitro* discontinuo (*batch*) y semicontinuo (Rusitec). El primer estudio evaluó los efectos de las condiciones de secado (liofilización y secado en horno a 40ºC durante 72 h y 60ºC durante 48 h) sobre el contenido de compuestos bioactivos, la capacidad antioxidante y la composición química del OU País. Posteriormente se utilizó un sistema de fermentación *in vitro* (*batch*) para evaluar los parámetros de fermentación ruminal y el potencial de mitigación de CH_4 del OU País bajo distintas condiciones de secado. El secado en horno a 60ºC durante 48 h de OU País retuvo el mayor contenido de proantocianidinas (68.9 mg de catequina equivalente/g de materia seca [MS]), y menores contenidos de cenizas, extracto etéreo y carbohidratos no fibrosos. Las muestras secadas en estas condiciones generaron una

menor producción y rendimiento de CH_4, indicando que estas condiciones de secado permiten conservar el valor nutricional del OU País (contenidos de compuestos fenólicos, grasa y fibra), prolongar su vida útil y, su uso como ingrediente en la alimentación de rumiantes. En el segundo estudio se determinaron las condiciones óptimas de extracción asistida por microondas (EAM) para obtener un extracto polifenólico estandarizado de OU País. Estableciendo el rendimiento de extracción, contenidos de polifenoles totales (CPT), contenidos de proantocianidinas (PA) y capacidad antioxidante, para deteerminar la eficiencia del proceso de extracción. En comparación con la extracción sólido-líquido convencional, la EAM incrementó en 59% los CPT, en 60% los PA y en 182% la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. Los principales compuestos fenólicos primarios del extracto de OU País, identificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fueron ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, quercetina, naringina, kaempferol, catequina y epicatequina. El perfil lípidico del OU País esta constituido por 17.4% de ácidos grasos saturados y 82.3% de ácidos grasos insaturados, de los cuales el ácido graso linoleico el más abundante (60.4% del total). En el tercer estudio se evaluaron los efectos de la inclusión de OU País a diferentes concentraciones (0, 10%, 20% MS) en dietas para rumiantes altas (AF) y bajas en forraje (BF) sobre la producción de CH_4 y los parámetros de fermentación ruminal en un cultivo *in vitro* tipo *batch*. La inclusión de OU al 10% y 20% MS redujo las concentraciones de nitrógeno amoniacal en 48% y 58% respectivamente sin diferencias entre el tipo de dieta. Se registró una reducción el porcentaje de CH_4 en gas, las concentraciones de CH_4 por materia seca (MS) desaparecida del 14%, por la inclusión de OU al 20% MS, aunque este nivel de

inclusión generó una reducción en las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) en los dos tipos de dieta. Estos resultados indican que la sustitución parcial de las fuentes fibrosas por OU País seco, hasta un 20% MS en dietas altas y bajas en forraje tiene el potencial de reducir la producción de nitrógeno amoniacal y la producción y el rendimiento de CH_4, sin embargo, es esperable una reducción de la desparición *in vitro* de la MS (DIVMS) cuando sustituye fuentes forrajeras de mayor calidad. El cuarto estudio evaluó los efectos de la inclusión de OU País al 20% MS en dietas para rumiantes altas (AF) y bajas (BF) en forraje, sobre los parámetros de fermentación ruminal, desaparición de nutrientes, producción de CH_4 y las poblaciones de metanógenos, hongos y principales bacterias fibrolíticas en un sistema de fermentación Rusitec. En este ensayo se usó OU País para sustituir parcialmente el heno mixto en la dieta AF, y totalmente el ensilaje de maíz en la dieta BF. Los resultados de este estudio indican que la inclusión de OU País 20% MS puede reducir la degradación de la proteína, la producción de nitrógeno amoniacal y las emisiones de CH_4, en dietas altas en forraje sin comprometer la digestión de nutrientes, pero su inclusión en dietas bajas en forraje puede reducir la DIVMS y la desaparición de fibra, por efectos sobre las poblaciones fibrolíticas presentes en el cultivo. Este estudio permitió determinar que la inclusión de OU País reduce las poblaciones de metanógenos presentes en las fracciones sólidas y líquidas de cultivo y modifica las poblaciones de microorganismos fibroliticos sin afectar su funcionalidad.

El quinto estudio evaluó los efectos de dosis crecientes (0, 0.7, 1.4 y 2.1% MS) de un extracto polifenólico estandarizado de orujo de uva País (EOU) sobre los parámetros de

fermentación ruminal, desaparición de nutrientes, producción de CH_4 y las poblaciones de metanógenos, hongos y principales bacterias fibrolíticas de una dieta alta en forraje (AF) en un sistema de fermentación semicontinuo Rusitec. La inclusión del EOU a la dieta no afectó la DIVMS, la producción de gas, la producción total de AGV, o la producción de ácido acético, pero incrementó la desaparición *in vitro* de la fibra detergente neutro (FDN), y redujo la desaparición *in vitro* de la proteína cruda (PC), la producción diaria de nitrógeno amoniacal ($N\text{-}NH_3$) y la proporción molar de los ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR; iso-valerato + iso-butirato). La inclusión de EOU hasta 2.1% MS en una dieta AF redujo la producción y el rendimiento de CH_4 hasta un 30%, redujo las poblaciones de metanógenos totales y las poblaciones de *Fibrobacter succinogenes*, una de las principales bacterias celulolíticas del rumen, sin embargo, las poblaciones de *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y de hongos se incrementaron por efecto del EOU. El sexto estudio evaluó los efectos de un extracto polifenólico de OU País solo (2.1% MS) o en combinación con aceite de OU en dosis crecientes (2.5% y 5% MS) en una dieta AF sobre los parámetros de fermentación, la producción de CH_4 y las poblaciones microbianas, en condiciones *in vitro* en un sistema de fermentación tipo *batch*. La inclusión de aceite de OU redujo la DIVMS, pero no las concentraciones de AGV totales, e incrementó en 18% la proporción molar de propionato. Una reducción en la concentración de $N\text{-}NH_3$ en 29% y las concentraciones molares de AGCR en 18% por efecto del extracto de OU, pero no hubo efectos por el aceite de OU. La producción de CH_4 fue reducida en 31% y el rendimiento de CH_4 en 34% por efecto de la interacción ente el extracto de OU y el aceite de OU cuando se evaluó la dosis máxima de aceite de

OU (5% MS). Las poblaciones de metanógenos fueron reducidas por la interacción entre el extracto de OU y el aceite de OU. Las poblaciones de *Butyribvibrio fibrisolvens* se incrementaron por efecto de la interacción entre el extracto de OU y del aceite de OU. De acuerdo con estos resultados es posible concluir que el extracto polifenólico de OU País posee un mayor potencial antimetanogénico que el aceite de OU o su combinación, además no afecta la fermentación ruminal, y posee un gran potencial para reducir la proteolisis ruminal.

Los resultados indican que el secado en horno a 60°C durante 48 horas permite conservar el valor nutricional del OU País (compuestos fenólicos, grasa y fibra), prolongar su vida útil y su uso como ingrediente en dietas para rumiantes. El OU País puede ser incluido en dietas de rumiantes en sustitución parcial de fuentes forrajeras de calidad media, sin afectar la fermentación ruminal, y con efectos positivos como la reducción en la producción de N-NH_3 y la producción de CH_4 por MS incubada y desaparecida. Su inclusión modifica la estructura de las poblaciones microbianas del rumen, sin perjudicar la diversidad microbiana, la DIVMS, o la producción de gas. Estos resultados indican que los efectos del OU País y su extracto polifenólico sobre la producción y rendimiento de CH_4 son resultado de un efecto directo de los polifenoles y los taninos condensados (TC), así como del aceite de OU País sobre los microorganismos involucrados en la metanogénesis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La demanda mundial de alimentos y particularmente de productos animales, continuará aumentando en las próximas décadas impulsada por el crecimiento de la población humana. De acuerdo con proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la demanda de productos cárnicos para el año 2030 se incrementará en 14% respecto a la producción del año 2020, por lo cual se espera un crecimiento de 5.9% y 15.7% en la disponibilidad de carne bovina y ovina (OECD/FAO 2021). La industria animal se enfrenta a los retos contradictorios de producir más, con menor uso de recursos, adaptarse y contrarrestar el cambio climático (CC). La producción de carne fue responsable del 54% del total de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) de la agricultura durante el periodo 2018-2020 (OECD/FAO 2021), adicionalmente, los rumiantes contribuyen a la huella ambiental de la agricultura mediante la generación del 18% del CH_4 atmosférico (Xu *et al.* 2021) y del 32% de las emisiones de óxido nitroso (N_2O) (Uwizeye *et al.* 2020). El 88% del CH_4 aportado por los rumiantes proviene de la fermentación entérica. Para impedir el incremento de la temperatura global en 1,5 ºC, las emisiones de CH_4 entérico deberán reducirse entre el 11 y el 30% en el año 2030, y entre el 24 y 47% en 2050, comparado con las emisiones de 2010 (Arndt *et al.* 2022). El CH_4 entérico además de las implicaciones ambientales, representa pérdidas entre el 2 y el 12 % de la energía bruta (EB) ingerida por el animal (Johnson y Johnson, 1995), porcentaje que depende de factores, como la ingesta de alimento, la proporción de

concentrado y forraje y el nivel de grasa de la dieta. Este panorama define como reto actual de la ganadería la reducción de las pérdidas de energía por emisiones de CH_4 entérico y el incremento de la productividad animal para alcanzar las demandas de carne y leche de una sociedad creciente.

Múltiples medidas han sido propuestas para reducir las emisiones de CH_4, algunas radicales como la reducción del consumo de carne con la consiguiente reducción de la población de rumiantes, medida que tiene un futuro incierto de acuerdo con la creciente demanda de carnes rojas por el aumento de la población y el incremento en la capacidad de compra de países en desarrollo (FAO, 2017). En general, las estrategias de reducción de las emisiones se clasifican en tres grupos: manejo de los animales y de los alimentos, formulación de dietas, y manipulación del rumen. Si bien se ha establecido que el incremento en la calidad del alimento, la disminución en la madurez de los forrajes y la reducción en la relación forraje-concentrado en la dieta, son eficaces para reducir las emisiones de CH_4, alcanzando reducciones promedio en el rendimiento del 12%. El uso de inhibidores de la metanogénesis como forrajes ricos en taninos y el uso de aceites y grasas genera reducciones en el rendimiento de CH_4 del 17% y de las emisiones diarias del 21% (Arndt *et al.* 2022). La manipulación de los sistemas de alimentación y el uso de suplementos nutricionales en rumiantes pueden modular los procesos digestivos, reduciendo la producción de CH_4, incrementando la eficiencia energética y el rendimiento de los animales (Min *et al.* 2020), adicionalmente, se ha demostrado que, en rumiantes, el uso de estrategias nutricionales es una poderosa herramienta para mejorar el metabolismo y reducir las emisiones de N_2 (Tan *et al.* 2021).

Además de las implicaciones en la generación de GEI, la amenaza sobre los sistemas alimentarios y la seguridad alimentaria mundial por el CC, la limitada disponibilidad de recursos para incrementar la productividad y la creciente competencia entre humanos y animales por cereales y oleaginosas ha conllevado a considerar la búsqueda de nuevos ingredientes, especialmente de alimentos no convencionales, que puedan ser utilizados en la industria de la producción animal. Grandes cantidades de biomasa residual como subproductos del sistema agroalimentario son generados anualmente, los cuales pueden representar hasta el 50% de la producción (Kasapidou *et al.* 2015), que podrían ser usados como materias primas para alimentación animal. El uso adecuado de subproductos agrícolas y agroalimentarios puede constituir una alternativa valiosa a los sistemas de alimentación animal, especialmente cuando estos además poseen potencial para reducir las emisiones de GEI y reducir costos de producción. Además, la suplementación dietética con productos o subproductos ricos en lípidos y metabolitos secundarios como polifenoles (PP) y taninos condensados (TC) no solo son útiles para reducir las emisiones de CH_4; también son estrategias prometedoras para incrementar la calidad del producto final, alterar la excreción de nitrógeno, y generar efectos benéficos sobre la salud de los animales (Vasta *et al.* 2019). Su uso en la alimentación animal puede añadir valor a los subproductos agrícolas generando beneficios económicos y reduciendo la eliminación de estos en el ambiente (Ayoo *et al.* 2020). Sin embargo, la amplia variabilidad del valor alimentario de los subproductos agrícolas y alimentarios es una limitante para su uso de forma masiva (Kasapidou *et al.* 2015).

El orujo de uva (OU) es un residuo de la vinificación que en países productores de vino ha sido incorporado a la alimentación animal, contiene cantidades significativas de ácidos grasos (AG) y metabolitos secundarios (Hixson *et al.* 2016), potencialmente benéficos para la salud animal, la productividad y la calidad del producto final. Adicionalmente, se ha indicado su potencial para reducir las emisiones de CH_4 (Moate *et al.* 2020) y la excreción de nitrógeno (Vinyard *et al.* 2021). La cepa ancestral País (*Vitis vinifera* L.), la cuarta más plantada en Chile (SAG, 2019), es conocida por su rusticidad, resistencia a plagas y contenidos de proantocianidinas (PA) superiores a los de variedades más ampliamente utilizadas en la industria vinícola (Godoy *et al*, 2012), característica que la hace interesante para la industria de bioprocesos. La industria del vino enfrenta el reto de reducir los impactos ambientales derivados de la disposición del OU.

Grandes cantidades son producidas anualmente, las cuales constituyen un importante problema de manejo y costos para el sector vinícola (Beres *et al.* 2017). Se han propuesto alternativas para su manejo que generan escaso valor agregado y se orientan particularmente al compostaje y su uso como enmienda para los cultivos. La información sobre el valor nutricional de los diversos tipos de OU disponibles en cantidades crecientes en Chile es limitada. Se ha demostrado que el uso de OU en la alimentación animal puede constituir una alternativa productiva, económica y ambientalmente viable (Moate *et al.* 2014; Caetano *et al.* 2019; Moate *et al.* 2020; Tayengwa *et al.* 2021). La evaluación del potencial de uso del OU variedad País como ingrediente o aprovechando su contenido polifenólico como aditivo en la alimentación de rumiantes permitiría proponer una

estrategia de manejo de un subproducto agroindustrial que actualmente constituye un contaminante ambiental, incrementar la rentabilidad de la producción de rumiantes, y reducir los impactos ambientales de la producción ganadera.

Esta tesis aborda la exploración de alternativas de uso de residuos industriales que reduzcan los impactos ambientales e incrementen la sostenibilidad de la producción ganadera. En este sentido, considerando las ventajas previamente descritas del uso de OU en la alimentación de rumiantes, las potencialidades nutraceúticas de la uva País (Capítulo 1) y su disponibilidad en la región de Ñuble, aborda como interrogante inicial los efectos del uso de OU País seco sobre la fermentación ruminal, las emisiones de CH_4 y las poblaciones microbianas ruminales. Para responder a este interrogante. El primer estudio (Capítulo 2) cubrió un vacío de información sobre la composición química, el perfil lipídico, el perfil de compuestos fenólicos y parámetros de fermentación ruminal del OU País sometido a diferentes condiciones de secado, con el fin de establecer una estrategia de conservación de este recurso. Este estudio incluyó la identificación de las condiciones optimas de extracción asistida por microondas para la generación de un extracto polifenólico estandarizado de OU País con potencial para la industria de aditivos animales. Considerando la composición química y de metabolitos secundarios del OU País obtenidos en el estudio 1, el estudio 2 (Capítulo 3) fue diseñado para responder a interrogantes sobre los ingredientes alimenticios que el OU País pudiera sustituir, si el contenido la relación forraje-concentrado de la dieta representaría un factor que generaría efectos diferenciados en los parámetros de fermentación ruminal y la producción de CH_4,

y cual sería el nivel máximo de inclusión de OU País en la dieta. Un estudio en un sistema de fermentación discontinuo (*batch*) fue diseñado para establecer la concentración máxima de inclusión de OU País, y los efectos sobre los parámetros de fermentación ruminal y producción de CH_4 según el tipo de dieta. Un estudio en Rusitec fue diseñado para conocer la magnitud de reducciones en las emisiones de CH_4 cuando OU País sustituye parcial algunas fuentes fibrosas de la dieta, sus efectos sobre la desaparición de nutrientes, y las poblaciones microbianas de interés. Considerando que se ha demostrado la utilidad de extractos polifenólicos para reducir las emisiones de CH_4 y a fin de identificar una concentración viable y sus efectos sobre sobre la fermentación ruminal, desaparición de nutrientes, la producción de CH_4 y las poblaciones microbianas se diseñó un estudio en Rusitec usando dosis crecientes del extracto polifenólico estandarizado de OU País (EOU) obtenido, en una dieta alta en forraje. Dado que la magnitud en la reducción de CH_4 no difirió sustancialmente en los estudios realizados en Rusitec con OU País y con extracto, surgió el interrogante si estas reducciones son resultado del efecto de los polifenoles o el aceite presente en el OU. Por lo cual se diseñó un estudio en el cual se evaluó el efecto combinado del EOU y aceite de OU sobre los parámetros de fermentación ruminal, producción de CH_4 y poblaciones microbianas del rumen, en un sistema de fermentación semicontinuo (*batch*). La Figura 1.1 presenta la estructura de esta tesis.

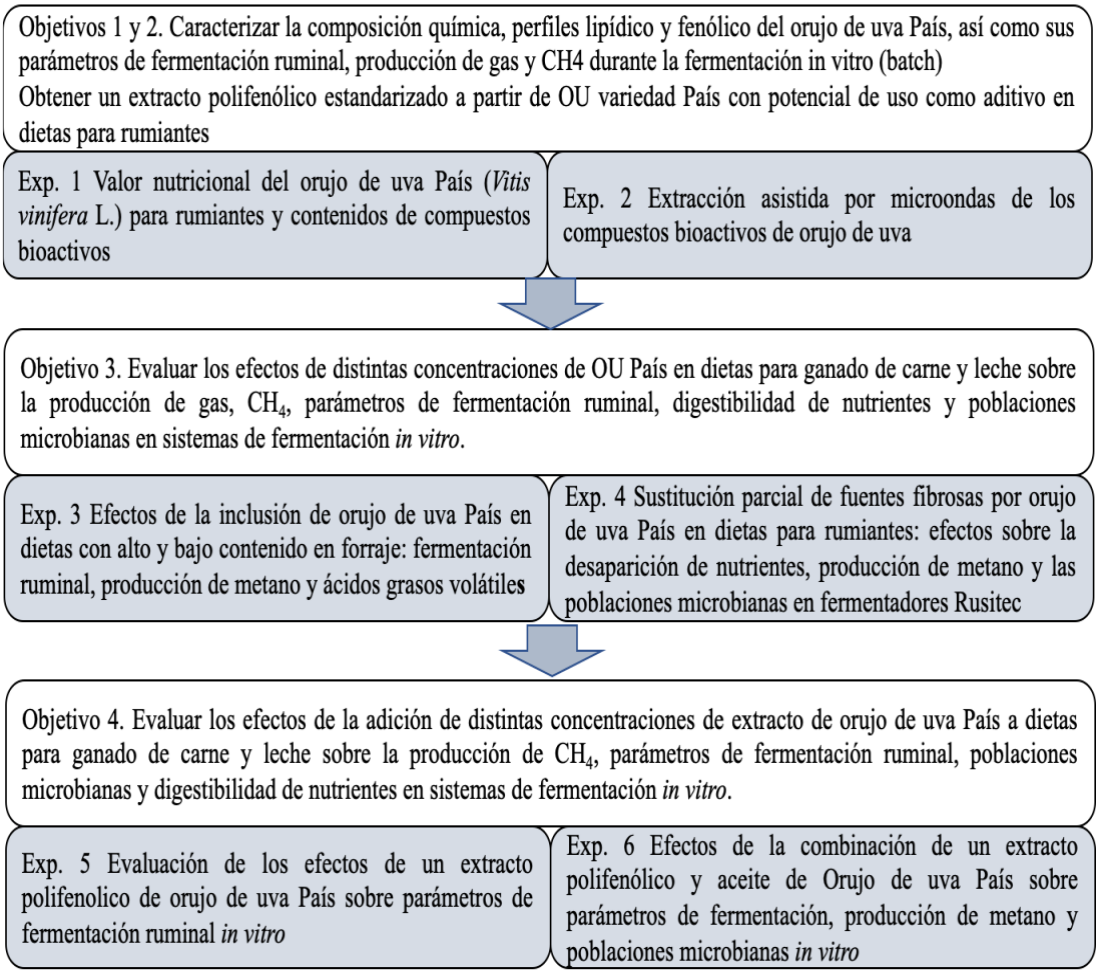


Figura 1.1. Estructura de esta tesis

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del uso del OU País y de un extracto polifenólico estandarizado de OU sobre la fermentación ruminal, producción de CH_4 y poblaciones microbianas en dietas para rumiantes en condiciones *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la composición química, perfiles lipídico y fenólico del OU País, así como sus parámetros de fermentación ruminal, producción de gas y CH_4 durante la fermentación *in vitro* (*batch*).

- Evaluar los efectos de distintas concentraciones de OU País en dietas para rumiantes altas y bajas en forraje sobre la producción de gas, CH_4, parámetros de fermentación ruminal, digestibilidad de nutrientes y poblaciones microbianas en sistemas de fermentación *in vitro*.

- Obtener un extracto polifenólico estandarizado a partir de OU País y evaluar sus efectos sobre la producción de gas, CH_4, parámetros de fermentación ruminal, digestibilidad de nutrientes y poblaciones microbianas en sistemas de fermentación *in vitro*.

- Identificar los efectos de las fracciones lipídica y polifenólica del OU País sobre los parámetros de fermentación ruminal, poblaciones microbianas en condiciones *in vitro*.

CAPITULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 INTRODUCCIÓN

El sistema alimentario es un importante promotor de los impactos antropogénicos sobre el sistema terrestre, siendo la producción de alimentos de origen animal el principal responsable de las emisiones de GEI, además afecta de manera significativa los ciclos biogeoquímicos, y ocupa un alto porcentaje del suelo útil. Estos impactos son impulsados sustancialmente por la producción ganadera. La producción de alimentos balanceados es un importante promotor del uso de fertilizantes y uso de tierras de cultivo, incrementando los impactos ambientales de la producción ganadera. Pese a esto, el sector ganadero hace diversos aportes a la sociedad humana garantiza una nutrición adecuada a menor costo, los sistemas de producción de rumiantes en pastoreo contribuyen a la salud del suelo, por incremento del carbono orgánico y la microbiota del suelo, y además incrementan el secuestro de carbono atmosférico. Así mismo, la ganadería contribuye a los medios de vida de muchos de los pobres del mundo, proporcionando fuerza de tiro, combustibles, fibras, seguridad económica y posición social (Gaughan *et al.* 2019).

La demanda global de alimentos se incrementará en un 45% para el año 2050 (FAO, 2017) y la de alimentos derivados de la producción animal en un 70% (Komarek *et al.* 2021). En consecuencia, la ganadería afronta el reto de producir más alimentos sin expandir la frontera agrícola, adoptar métodos de producción más eficientes y sostenibles, y adaptarse al CC. Si la eficiencia de los alimentos balanceados se mantiene como hasta hoy, para cubrir esta demanda se requerirá de un incremento de alrededor de 7.000 millones de toneladas de materia seca por año (Kim *et al.* 2019), lo cual incrementará la competencia entre humanos y animales por cereales y oleaginosas, con importantes impactos ambientales, como el incremento en las emisiones de GEI, particularmente CH_4 entérico, GEI con potencial de calentamiento global 28 veces superior al CO_2, importante también en el aspecto productivo dado que este representa una pérdida de energía bruta digerida de hasta el 12% (Johnson y Johnson, 1995).

El oxido nitroso (N_2O) es un contaminante atmosférico que posee un tiempo de vida de hasta 150 años y es el más potente de los tres principales GEI, con un poder de calentamiento global casi 300 veces mayor que el CO_2 en un horizonte de 100 años. Participa directamente en la formación de contaminantes secundarios (ácido nítrico y nitrato de amonio, entre otros) y el agotamiento del ozono estratosférico. La ganadería influye en los flujos globales de nitrógeno (N) a través de la aplicación de fertilizantes nitrogenados sintéticos y estiércol en tierras de cultivo y pastizales, el manejo y acumulación de estiércol y el transporte de productos ricos en N como piensos, alimentos

y estiércol (Sutton *et al.* 2013). El amoniaco (NH_3) representa la mayor pérdida de nitrógeno reactivo de los sistemas de producción ganadera (Fowler *et al.* 2013).

La manipulación de los sistemas de alimentación y el uso de suplementos nutricionales en rumiantes pueden modular los procesos digestivos, reduciendo la producción de CH_4, incrementando la eficiencia energética y el rendimiento de los animales (Min *et al.* 2020), adicionalmente, se ha demostrado que en rumiantes, el uso de estrategias nutricionales es una poderosa herramienta para mejorar el metabolismo y reducir las emisiones de nitrógeno (Tan *et al.* 2021).

La amenaza sobre los sistemas alimentarios y la seguridad alimentaria mundial por el CC, la limitada disponibilidad de recursos para incrementar la productividad y la competencia entre humanos y animales por cereales y oleaginosas ha conllevado a considerar la búsqueda de nuevos ingredientes, especialmente de alimentos no convencionales, que puedan ser utilizados en la industria de la producción animal. Grandes cantidades de biomasa residual como subproductos del sistema agroalimentario son generadas, pudiendo representar hasta el 50% de la producción (Kasapidou *et al.* 2015). Esta biomasa podría ser usada como materias primas para alimentación animal. El uso adecuado de subproductos agrícolas puede constituir una alternativa valiosa a los sistemas de alimentación animal, especialmente cuando estos además poseen potencial para reducir las emisiones de GEI y reducir costos de producción. La suplementación con productos o subproductos ricos en lípidos y metabolitos secundarios como PP y TC son

estrategias prometedoras para incrementar la calidad del producto final, alterar la excreción de nitrógeno, y reducir las emisiones de CH_4 del ganado, además de generar efectos benéficos sobre la salud de los animales (Vasta *et al.* 2019). Su uso en la alimentación animal puede añadir valor a los subproductos agrícolas generando beneficios económicos y reduciendo la eliminación de estos al ambiente (Ayoo *et al.* 2020). Sin embargo, la variabilidad del valor alimentario de los subproductos agrícolas y alimentarios, que depende de muchos aspectos, es una limitante para su uso de forma masiva (Kasapidou *et al.* 2015).

El orujo de uva (OU) es un residuo de la vinificación que tradicionalmente ha sido incorporado a la alimentación animal en distintos países productores de vino, y que en los últimos años esta siendo investigado, por contener cantidades significativas de AG y metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides; Hixson *et al.* 2016), que pueden generar beneficios para la salud y productividad del animal, mejorar la calidad de los productos finales (leche y carne) y reducir el impacto ambiental de las explotaciones ganaderas al reducir las emisiones de CH_4 (Moate *et al.* 2014, Moate *et al.* 2020) y la excreción de nitrógeno en la orina (Greenwood *et al.* 2012; Vinyard *et al.* 2021).

Chile es el cuarto exportador mundial de vino, alcanzando una producción total de cercana a los 1.400 millones de litros en 2021, por lo que la viticultura está fuertemente ligada a la economía nacional. La cepa ancestral País (*V. vinifera* L.), también conocida como Misión o Negra Criolla, variedad de uva tinta es la cuarta más plantada en el país

(SAG, 2019). Sin embargo, su aporte a la producción de vino es muy bajo, alcanzando sólo el 2% de la producción nacional (SAG 2021). La cepa País es conocida por su rusticidad, resistencia a plagas y su alto contenido de proantocianidinas (PA), que supera los contenidos reportados para variedades más cultivadas como Pinot noir y Carmenère (Godoy *et al*, 2012), lo que afecta su competitividad en la industria vitivinícola, pero la hace atractiva para la industria de bioprocesos. La variedad País está especialmente vinculada a la agricultura familiar minifundista, que recibe una baja rentabilidad por la actividad, por lo cual una alta proporción de la cosecha es abandonada en campo sin generar retorno financiero (Ide *et al.* 2021). Los impactos ambientales de la disposición del OU, constituyen un importante problema de manejo, que afecta en mayor proporción a medianos y pequeños productores, quienes además de enfrentar una baja rentabilidad, deben disponer de este residuo a costa del producto final (Beres *et al.* 2017). En este contexto, encontrar usos que permitan la valorización de este recurso y que incrementen la rentabilidad es un reto.

Las grandes cantidades de OU que se producen cada año son acumuladas y constituyen un problema de costos y gestión ambiental para la industria vinícola. Si bien, se han propuesto alternativas para su manejo, estas generan escaso valor agregado y se orientan particularmente al compostaje y su uso como enmienda para los cultivos. La información sobre el valor nutricional para el uso, de los diversos tipos de OU disponibles en cantidades crecientes en Chile, es escasa y se limita a variedades comerciales como Carménère. La cepa País dada su disponibilidad y potencial contenido de compuestos

bioactivos, puede ser un recurso de interés para la alimentación animal; se ha demostrado que el uso de OU en la alimentación animal puede constituir una alternativa productiva, económica y ambientalmente viable (Moate *et al.* 2014; Caetano *et al.* 2019; Moate *et al.* 2020; Tayengwa *et al.* 2021). La evaluación del potencial de uso del OU variedad País como ingrediente o aprovechando su contenido de polifenólico como aditivo en la alimentación de rumiantes permitiría proponer una estrategia de manejo de un subproducto agroindustrial que actualmente constituye un contaminante ambiental, incrementar la rentabilidad de la producción de rumiantes, y reducir los impactos ambientales de la producción ganadera.

El objetivo de esta revisión es ofrecer una visión general de los efectos del potencial de uso del OU en dietas de rumiantes, discutiendo su composición, efectos sobre las emisiones de CH_4, la excreción de nitrógeno, los microorganismos que participan en la fermentación ruminal, así como los resultados de las principales investigaciones sobre OU en la alimentación de rumiantes de los últimos 10 años.

1.2 ORUJO DE UVA

Los desechos de la industria vinícola mundial, constituidos principalmente por raspones, lías, aguas residuales y OU, son elementos altamente contaminantes debido a la presencia de compuestos orgánicos, al pH, la salinidad, contenidos de metales pesados, y

sus elevados volúmenes de producción en un corto periodo (Beres *et al.* 2017). A pesar de ser la práctica dominante, la disposición de OU prensado directamente en suelos de cultivo puede causar fitotoxicidad debido a sus contenidos de taninos y polifenoles (Gómez-Brandón *et al.* 2019), además por sus contenidos de materia orgánica puede incrementar la demanda biológica de oxígeno del suelo, contaminar aguas subterráneas e incrementar las emisiones primarias de GEI, particularmente CH_4 y N_2O (Christ y Burrit, 2013).

El OU representa entre el 10-30% del peso de la uva procesada en la vinificación (Muhlack *et al.* 2018). Se estima que por cada litro de vino se producen 6 kilos de OU, constituidos por pieles (48%), semillas (25%); y pulpa, tallos y otros componentes (27%) (Dávila *et al.* 2017). Los constituyentes primarios del OU son carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa, arabinosa, xilanos y mananos) que constituyen el 30% de la materia seca, pectina que constituye el 20% materia seca, proteínas, grasas, y compuestos fenólicos, que van desde moléculas simples como los ácidos hidroxicinámico e hidroxibenzoico hasta moléculas complejas como flavonoides (Castellanos-Gallo *et al.* 2022). Los contenidos residuales de nutrientes, sus altos volúmenes de producción y la creciente preocupación por los impactos ambientales han generado durante los últimos años una acelerada búsqueda de alternativas de uso y valorización del OU. Por sus altos contenidos de carbohidratos estructurales el OU es considerado como fuente alternativa para la producción de energía, sin embargo, esta práctica conlleva riesgos de incremento en las emisiones de N_2O a la atmosfera (Saha *et al.* 2020). El OU es un material con elevado potencial para la recuperación de productos como aceite de semilla de uva, etanol,

tartrato, ácido cítrico y compuestos fenólicos (Spinei y Oroian, 2021). Los altos contenidos de compuestos fenólicos, así como los contenidos de ácidos grasos esenciales, proteínas, tocoferoles y β-caroteno hacen del OU un recurso de gran potencial nutracéutico para las industrias farmacéutica, alimentaria y de cosméticos (Ianni y Martino, 2020). El creciente interés por el uso de compuestos bioactivos en la alimentación de rumiantes ha hecho que la incorporación de OU en la alimentación se convierta en un campo de investigación atractivo (Babău *et al.* 2019).

1.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRICIONAL DEL ORUJO DE UVA

El OU es una matriz compleja formada por fibra insoluble y soluble, proteínas, minerales, y compuestos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos, flavonoides, antocianos y procianidinas (Antonić *et al.* 2020). Su composición química, así como la cantidad absoluta y la proporción relativa de los compuestos fenólicos en el OU presenta una alta variabilidad y están condicionadas por factores como la variedad de uva, las condiciones agroclimáticas, procedimientos de fertilización, propiedades del suelo, los procesos de vinificación, tipo de vino producido, así como el tiempo transcurrido en almacenamiento y los procedimientos de reciclaje (Beres *et al.* 2017). La amplia variabilidad en su composición representa un importante reto para la valorización de este subproducto (Milinčić *et al.* 2021). La Tabla 1.1 presenta la composición proximal del

OU tinto, reportada en las principales investigaciones realizadas durante el periodo 2012-2022. Los contenidos de humedad del OU fresco varían entre el 50-72%, sin importar su composición o variedad, lo cual afecta significativamente su utilidad tanto en la industria como en la alimentación animal. Estos contenidos de humedad hacen del OU un producto altamente perecedero y susceptible al desarrollo de microorganismos, por lo cual el proceso de deshidratación, manteniendo sus propiedades es esencial para prolongar su vida útil (Carmona-Jiménez *et al.* 2018). El secado es un proceso crítico en el manejo del OU, pues este puede provocar cambios bioquímicos y degradación de los compuestos bioactivos, especialmente los polifenoles, afectando a su capacidad antioxidante y valor biológico (Tseng y Zhao, 2012).

En el OU tinto, la fibra es el compuesto predominante. En general, las pectinas son los principales componentes de la pared celular de la uva, con valores que oscilan entre 37-54% del total de polisacáridos que constituyen esta estructura. El segundo polisacárido en abundancia en la pared celular es la celulosa (27 - 37%) (Spinei y Oroian, 2021). Los contenidos de carbohidratos estructurales en el OU presentan una amplia variabilidad, con rangos para FDN entre el 21% y 70%, para FDA entre 15% y 70%, y para lignina entre 13% y 48%, de la materia seca (MS). El orujo blanco fresco alcanza hasta un 38% MS de glucosa y fructosa, el OU tinto espumoso entre 18% y 30%, mientras que los vinos tintos reposados presentan un contenido de glucosa y fructosa en torno al 1% MS (Hixson *et al.* 2016).

El OU aunque presenta una baja digestibilidad en comparación con cereales y forrajes, y posee una menor energía metabolizable que la paja de trigo o avena, puede ser útil para sustituir forrajes de calidad media, en épocas de escasez (Muhlack *et al.* 2018). La reducida digestibilidad del OU es principalmente resultado de sus altos contenidos de lignina (Hanušovský *et al.* 2020), la cual interactúa con las fracciones de carbohidratos formando una red supramolecular que impide la ruptura de los enlaces químicos por los complejos enzimáticos microbianos del rumen, afectando la fermentación ruminal.

Tabla 1.1 Composición química de orujo de uva (% de la materia seca).

Parámetro	Valor	Referencia
Materia orgánica	91.8	Ishida *et al.* 2015
	92.3	Pop *et al.* 2015
	96.7	Winkler *et al.* 2015
	86.6	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.*2018; Vieira *et al.* 2022
	92.8	Barraso *et al.* 2020
	96.5	Giller *et al.* 2021
	96.0	Juráček *et al.* 2021
	94.1	Rolinec *et al.* 2021
	94.1	Tayengwa *et al.* 2021
	91.3	Vinyard *et al.* 2021
	90.2	Wu *et al.* 2022
Proteína cruda	12.2	Eleonora *et al.* 2014
	8.5	Sousa *et al.*2014
	9.5	Ishida *et al.* 2015
	16.6	Pop *et al.* 2015
	11.2	Winkler *et al.* 2015
	11.2-13.8	Brenes *et al.* 2016
	12.8	Chedea *et al.* 2016
	12.2	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2022
	7.7-14.4	Russo *et al.* 2017
	11.1	Buffa *et al.* 2019
	9.7	Caetano *et al.* 2019
	9.1	Chikwanha *et al.* 2019

	11.1	Nudda *et al.* 2019
	3.6-14.2	Antonić *et al.* 2020
	2.6-13.5	Atalay, 2020
	10.6	Barraso *et al.* 2020
	13.2	Moate *et al.* 2020
	6.5	Giller *et al.* 2021
	9.9	Jurácek *et al.* 2021
	9.4	Rolinec *et al.* 2021
	8.5	Spinei y Oroian., 2021
	11.1	Tayengwa *et al.* 2021
	12.8	Vinyard *et al.* 2021
	15.1	Wu *et al.* 2022
Extracto etéreo	6.1	Eleonora *et al.* 2014
	8.2	Sousa *et al.* 2014
	8.5	Ishida *et al.* 2015
	10.2	Pop *et al.* 2015
	5	Winkler *et al.* 2015
	5.6-11-7	Brenes *et al.* 2016
	5.5	Chedea *et al.* 2016
	6.4	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2022
	10.2	Hixson *et al.* 2018
	6.9	Buffa *et al.* 2019
	5.1	Caetano *et al.* 2019
	8.9	Chikwanha *et al.* 2019
	1.1-13.9	Antonić *et al.* 2020
	3.1-9.2	Atalay, 2020
	5.5	Barraso *et al.* 2020
	13.6	Moate *et al.* 2020
	1.5	Giller *et al.* 2021
	8.4	Jurácek *et al.* 2021
	8.2	Spinei y Oroian., 2021
	7.4	Tayengwa *et al.* 2021
	5.4	Vinyard *et al.* 2021
Cenizas	7.7	Eleonora *et al.* 2014
	4.6	Sousa *et al.* 2014
	8.2	Ishida *et al.* 2015
	7.1	Pop *et al.* 2015
	3.3	Winkler *et al.* 2015
	2.4-5.8	Brenes *et al.* 2016
	6.9	Chedea *et al.* 2016
	3.3	Buffa *et al.* 2019
	2.3	Caetano *et al.* 2019
	6.9	Chikwanha *et al.* 2019
	3.9-9.4	Atalay, 2020
	1.73-9.1	Antonić *et al.* 2020
	1.1	Moate *et al.* 2020

	4.0	Jurácek *et al.* 2021
	4.6	Spinei y Oroian, 2021
	5.9	Tayengwa *et al.* 2021
	8.7	Vinyard *et al.* 2021
	9.8	Wu *et al.* 2022
Fibra detergente neutro	47.4	Ishida *et al.* 2015
	34.1	Winkler *et al.* 2015
	54.2-70.8	Brenes *et al.* 2016
	32-37.6	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2022
	21.5-61.4	Russo *et al.* 2017
	42.6	Hixson *et al.* 2018
	52.7	Buffa *et al.* 2019
	56.3	Caetano *et al.* 2019
	40.1	Chikwanha *et al.* 2019
	26.6-58	Atalay, 2020
	49.9	Barraso *et al.* 2020
	61.5	Moate *et al.* 2020
	35.3	Giller *et al.* 2021
	45.9	Jurácek *et al.* 2021
	28.4	Rolinec *et al.* 2021
	31.8	Tayengwa *et al.* 2021
	52.5	Vinyard *et al.* 2021
Fibra detergente ácido	44.0	Ishida *et al.* 2015
	34.6	Winkler *et al.* 2015
	48-70.4	Brenes *et al.* 2016
	50.2	Chedea *et al.* 2016
	31.7	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.* 2018; Vieira *et al.* 2022
	16.2-56.1	Russo *et al.* 2017
	15.8	Hixson *et al.* 2018
	41.2	Caetano *et al.* 2019
	25-54	Atalay, 2020
	44.5	Barraso *et al.* 2020
	58.1	Moate *et al.* 2020
	32.5	Giller *et al.* 2021
	38.1	Jurácek *et al.* 2021
	25	Rolinec *et al.* 2021
	50.8	Vinyard *et al.* 2021
Lignina	23.6	Winkler *et al.* 2015
	30.7-47.5	Brenes *et al.* 2016
	20.7	Manso *et al.* 2016; Guerra-Rivas *et al.* 2017; Gómez-Cortés *et al.* 2018
	6.3-40.8	Russo *et al.* 2017
	26	Buffa *et al.* 2019
	13.8	Caetano *et al.* 2019

42.6	Moate *et al.* 2020
24	Giller *et al.* 2021
48.0	Tayengwa *et al.* 2021
34.5	Vinyard *et al.* 2021

Fuente: elaboración propia

Se ha reportado contenidos de proteína para OU entre 8.5-16.6% MS, por esta razón se ha considerado como una fuente barata y disponible de proteína y energía, especialmente en sistemas de producción de bajos insumos, con la ventaja adicional de los potenciales efectos positivos de sus compuestos secundarios, como los polifenoles (Chedea *et al.* 2016). Los contenidos de extracto etéreo del OU varían entre 1.5-13.9% MS, los cuales dependen principalmente del tipo de uva utilizada y su contenido porcentual de semillas, que oscila entre el 10-20% MS (Guerra-Rivas et a., 2016). El contenido de aceite de la semilla alcanza el 8-20% MS (Rombaut *et al.* 2015) y su rendimiento de extracción depende de la técnica utilizada, el solvente usado, la variedad de cultivares y de los factores ambientales durante el año de recolección. Aunque previamente se había considerado bajo el aporte de EM del orujo (5.8-8.3 MJ/kg MS; Baumgärtel *et al.* 2007), recientemente se han registrado mayores contenidos de EM en este recurso (10.25 MJ/kg MS, Hixson *et al.* 2016, 2018), diferencias relacionadas principalmente con el tipo de OU evaluado, OU blanco presenta mayor EM que OU tintos.

El aceite de semilla de uva posee un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (60-80%), principalmente ácido linoleico, que representa cerca del 70% de los ácidos grasos (García-Lomillo y González-San José, 2017). Además, contiene tocoferoles, tocotrienoides e isómeros de la vitamina E, que le confieren potencial

nutracéutico para el consumo humano (Lutterodt *et al.* 2011) y como modulador de la biohidrogenación (BH) y la fermentación ruminal (Correddu *et al.* 2014). La Tabla 1.2 presenta el perfil lipídico del OU.

Tabla 1.2 Perfil de ácidos grasos del orujo de uva

Acido graso	Valor (% ácidos grasos totales)	Referencia
C 16:0	9.4	Moate *et al.* 2014
	11.1	Manso *et al.* 2016
	11.0	Hixson *et al.* 2016
	12.4	Chikwanha *et al.* 2018
	5.5-7-8	Mohamed-Amed *et al.* 2019
	7.7	Kolláthová *et al.* 2020
	9.1	Moate *et al.* 2020
	8.4	Vašeková *et al.* 2020
	10.2	Vinyard *et al.* 2021
C 16:1	0.3	Moate *et al.* 2014
	0.6	Manso *et al.* 2016
	0.6-1	Mohamed-Amed *et al.* 2019
	0.22	Vašeková *et al.* 2020
	0.2	Moate *et al.* 2020
C18:0	4	Hixson *et al.* 2016
	4.4	Manso *et al.* 2016
	5	Chikwanha *et al.* 2018
	2-3.8	Mohamed-Amed *et al.* 2019
	4.0	Kolláthová *et al.* 2020
	4.1	Moate *et al.* 2020
	4.0	Vašeková *et al.* 2020
	4.6	Vinyard *et al.* 2021
C 18:1	15.8	Moate *et al.* 2014
	15.2	Hixson *et al.* 2016
	16.0	Manso *et al.* 2016
	11.1	Chikwanha *et al.* 2018
	15.1-20.1	Mohamed-Amed *et al.* 2019
	16.3	Kolláthová *et al.* 2020
	15.1	Moate *et al.* 2020
	16.3	Vašeková *et al.* 2020
	16.7	Vinyard *et al.* 2021
C 18:2	66.7	Moate *et al.* 2014
	65.8	Hixson *et al.* 2016

Acido graso	Valor (% ácidos grasos totales)	Referencia
	61.3	Manso *et al.* 2016
	64.8	Chikwanha *et al.* 2018
	68.7	Kolláthová *et al.* 2020
	68.9	Moate *et al.* 2020
	68.6	Vašeková *et al.* 2020
	63.6	Vinyard *et al.* 2021
C 18:3	1.5	Moate *et al.* 2014
	2.3	Hixson *et al.* 2016
	3.7	Manso *et al.* 2016
	0.24	Kolláthová *et al.* 2020
	0.3	Moate *et al.* 2020
	0.50	Vašeková *et al.* 2020
	1.37	Vinyard *et al.* 2021

Fuente: elaboración propia

En rumiantes el uso de dietas con altos niveles de ácido linoleico y niveles moderados de polifenoles (20-60 g/kg MS) incrementa la acumulación tisular de ácidos grasos poliinsaturados y sus productos intermedios de biohidrogenación (Mapiye *et al.* 2015), incluyendo el ácido ruménico [*cis*-9, *trans*11-18:2, y el ácido vaccénico (*trans*11-18:1) precursor del el ácido linoleico conjugado (CLA)], que son benéficos para la salud humana (Wannamethee *et al.* 2018).

La vinificación de tinto se realiza en contacto con las semillas y piel de la uva, que es donde se localiza el mayor contenido en compuestos fenólicos, de los cuales solo el 35% es transferido al vino, los polifenoles restantes permanecen en el OU (Beres *et al.* 2017), el cual puede ser recuperado dado su valor funcional. El contenido de polifenoles totales en el OU varía entre 0.2-8.7 g/100 g MS (Antonić *et al.* 2020). Aunque se han identificado muchos compuestos fenólicos en el OU, los compuestos más abundantes son las antocianas, los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, los flavan-3-oles, los

flavonoles y los estilbenos (Beres *et al.* 2017). Entre los flavanoles son de importancia los TC, que se encuentran particularmente en la semilla y en menor proporción en la pulpa. Las antocianas son pigmentos de color rojo que se producen durante la maduración, y son muy susceptibles a la acción de agentes como la luz, la temperatura, el oxígeno y el pH. Las principales antocianas de la piel de la uva son 3-O-glicósidos de malvidina, petunidina, cianidina, peonidina y delfidina (Souza *et al.* 2014). Los ácidos hidroxicinámicos incluyen los ácidos gallico, cafeico, ferúlico, p-cumárico, clorogénico y sinápico, y los ácidos hidroxibenzoicos incluyen el ácido p-hidroxibenzoico, el protocatéquico, el sirínico y el vanílico (Yu y Ahmedna, 2013). Los TC de semillas y pieles varían en su composición. Los TC de la piel poseen un mayor grado de polimerización, mayor relación cis/trans y porcentaje de subunidades de prodelfidinas. Los TC derivados de las semillas tienen menor grado de polimerización, menores proporciones de subunidades de prodelfidinas y mayores porcentajes de substitución por ácido gálico (Hixson *et al.* 2018). El principal estilbeno presente en el OU es el resveratrol, y los flavonoles más comunes en el OU son kaempferol, quercetina y miricetina (Beres *et al.* 2017). La tabla 1.3 presenta los contenidos fenólicos de algunos de los subproductos de la producción de vino.

Tabla 1.3 Contenidos fenólicos de subproductos de vitivinicultura

Subproducto	Polifenoles extraíbles	Taninos condensados	Referencia
Orujo de Uva	2.2 (% MS)	1.44 (%MS)	Pop *et al.* 2015
	78.36 (g/kg)	-	Hixson *et al.* 2016
	42.8 (g/kg)	54.6 (g/kg)	Manso *et al.* 2016
	42.8 (g/kg)	54.6 (g/kg)	Gómez-Cortés *et al.* 2018
		64.9*(g/kg)	Chikwanha *et al.* 2019

Subproducto	Polifenoles extraíbles	Taninos condensados	Referencia
	75.4-147-5 (mg GAE/100 g)		Mohamed Ahmed *et al.* 2019
		2-16.4% MS	Atalay, 2020
	14.8-70.5 (g/kg)	39.1-105 (g/kg)	Correddu *et al.* 2020
	-	1.6 (k/kg)	Moate *et al.* 2020
	27.38 (g/kg)	-	Vašeková *et al.* 2020
	58.6 (g/kg)	55.5 (g/kg)	Giller *et al.* 2021
	5.76 (g/kg)	5.51 (g/kg)	Vinyard *et al.* 2021
	42.8 (g/kg)	54.6 (g/kg)	Vieira *et al.* 2022
	16 (g gallico ácido equivalente/kg MS)	22.21 (g catequina equivalentes /kg DM).	Wu *et al.* 2022
Semilla de uva	68.3	-	Sphanghero *et al.* 2009
	55	93.5	Guerra-Rivas *et al.* 2016
Pulpa de uva	32.1	19.4	Guerra-Rivas *et al.* 2016

Fuente: elaboración propia

Los contenidos totales, el perfil y la distribución de los polifenoles en la uva, varían según la variedad de uva, el nivel de madurez y las condiciones climáticas. Los procesos de vinificación también afectan los contenidos y perfiles fenólicos en el OU (Ky *et al.* 2014). La comparación entre los datos obtenidos en los diferentes trabajos es difícil, pues estas varían en función de los métodos utilizados para su extracción y determinación. Orujos de uva variedad Carménère cultivados en Chile presentan contenidos de flavonóles totales entre 406.25 mg/g y 581.35 mg/g y altos niveles de TC (612.96 mg/g; Cerda, 2014). Los compuestos fenólicos del OU poseen reconocidas propiedades antiinflamatorias, anti apoptosis, antimicrobianas y antioxidantes (Granda y de Pascual-Teresa, 2018). La Tabla 1.4 presenta el perfil de compuestos fenólicos del OU.

Tabla 1.4 Perfil de compuestos fenólicos del orujo de uva

Compuesto fenólico	Contenido (g/kg ms)	Referencia
	Compuestos no flavonoides	
Ácidos fenólicos		
Acido cafeico	2.57	Antoniolli *et al.* 2015
	16.9	Cerda, 2014
Acido p-cumárico	10.4	Antoniolli *et al.* 2015
Acido ferúlico	3.88	Antoniolli *et al.* 2015
	9.88	Cerda, 2014
Ácidos benzoicos		
Acido gálico	146	Peixoto *et al.* 2018
Acido siringíco	279	Antoniolli *et al.* 2015
	16.9	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	54.2	Guerra-Rivas *et al.* 2016
Estilbenos		
Polydatin	1.98	Antoniolli *et al.* 2015
Transresveratrol	5.79	Antoniolli *et al.* 2015
	1.08	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	Compuestos flavonoides	
Flavonoides		
Quercetina	3.62	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	1.10	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	89.7	Antoniolli *et al.* 2015
Kaemferol	0.11	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	1.67	Guerra-Rivas *et al.* 2016
Kaempferol-3-glucósido	82.5	Jara-Palacios *et al.* 2014
Miricetina	5.09	Guerra-Rivas *et al.* 2016
Flavan-3-oles		
Catequina	146	Peixoto *et al.* 2018
	12.3	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	6.79	Guerra-Rivas *et al.* 2016
	546	Antoniolli *et al.* 2015
	628.3	Cerda, 2014
Epicatequina	984	Peixoto *et al.* 2018
	284	Antoniolli *et al.* 2015
	404	Jara-Palacios *et al.* 2014
	467.34	Cerda, 2014
Proantocianidinas	3.35	Jara-Palacios *et al.* 2014
	612.96	Cerda, 2014
Antocianos		

Compuesto fenólico	Contenido (g/kg ms)	Referencia
Antocianos totales	7.9	Peixoto *et al.* 2018
	13.24	Cerda, 2014
	4.90	Guerra-Rivas *et al.* 2016

Fuente: elaboración propia

1.3 USO DE ORUJO DE UVA EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

El OU fue considerado tradicionalmente como un recurso de escaso valor nutricional (Alipour y Rouzbehan, 2007; Baumgärtel *et al.* 2007), y se asoció a un inadecuado manejo nutricional, bajas tasas de crecimiento o de producción, e impactos negativos en la ingesta y la producción. Solo el 3% del OU producido en el mundo se destina a la alimentación animal, particularmente a dietas de mantenimiento o bajos requerimientos productivos en rumiantes (Brenes *et al.* 2016), el cual puede ser utilizado en forma fresca, seco o ensilado. Su uso como ración básica ha sido explorado (Pirmohammadi *et al.* 2007), aunque se ha demostrado que la inclusión de altos niveles de OU en la dieta reduce la degradabilidad y digestibilidad de nutrientes (Abarghuei *et al.* 2010). Los resultados de los efectos de la inclusión de OU en la alimentación de rumiantes sobre los parámetros productivos son ampliamente variables, atribuido a la variabilidad de su valor nutricional y contenidos de compuestos bioactivos (Guerra-Rivas, 2016), así como los volúmenes incorporados a la dieta. La suplementación de dietas altas en forraje con 5 y 10% con OU seco incrementó la digestibilidad de los alimentos y el crecimiento de corderos (Bahrami *et al.* 2010), aunque la sustitución del forraje a niveles del 30% MS, redujo la disponibilidad de energía metabolizable (EM) e impactó negativamente la

ganancia de peso y la conversión alimenticia en ganado de carne (Caetano *et al.* 2019, Vinyard *et al.* 2021). Por otra parte, la substitución de niveles superiores al 30% MS de forraje por OU redujo la producción láctea y alteró la composición de la leche en vacas lecheras (Moate *et al.* 2020). Si bien, estos resultados indican que el uso de OU puede afectar negativamente la productividad, en algunos casos como en Australia, el OU es usado en época de verano cuando la escasez de forraje obliga a buscar suplementos alimenticios, lo cual constituye una estrategia de aprovechamiento de los recursos disponibles por parte de los productores (Moate *et al.* 2020)

Contrario a estos resultados, la inclusión de OU hasta el 30% en dietas de base forrajera para ovinos incrementó el consumo, sin afectar negativamente el crecimiento y los parámetros productivos (Calderón-Cortés *et al.* 2018; Amaral *et al.* 2019). El OU en sustitución del 20% MS de la ración, mantuvo la productividad de ovinos, con efectos positivos sobre la salud animal (Wu *et al.* 2022), y el suministro de ensilaje de OU hasta el 10% MS en vacas lecheras, no afectó negativamente la producción, ni la calidad de la leche (Santos *et al.* 2014), por otra parte, suplementación con ensilaje de OU incrementó la ganancia de peso y la calidad de la carne de corderos (Kafantaris *et al.* 2018). La tabla 1.5 presenta los resultados productivos, de calidad de productos y de fermentación del uso de OU en diferentes ensayos realizados en el periodo 2012-2022.

Tabla 1.5. Efectos la incorporación de orujo de uva a dietas de rumiantes en ensayos realizados entre 2012-2022.

Inclusión	Tipo de dieta	Especie	Ensayo	Resultados		Referencias
OU ensilado o peletizado al 27% MS	Forraje, concentrado y OU	Bovinos leche	*In vivo*	N-NH_3	=	Moate *et al.* 2014
				Acido acético	↓	
				Producción láctea	↓	
				Grasa láctea	↓	
				cis C18:1n-9	↑	
				cis C18:2n-6	↑	
OU seco al 10, 12.5 y 15% MS OU seco 3, 4 y 5 kg/día	ND	Corderos Vacas lecheras	*In vivo*	Ganancia de peso	↓	Nistor *et al.* 2014
				Prod. láctea	=	
OU 16.6%	TMR	Bovinos	*In vivo*	Digestibilidad de la proteína	↓	Ishida *et al.* 2015
				N fecal	↑	
				N-NH_3	↓	
OU seco 7.5% MS	Dieta 50:50 forraje-concentrado	Ovejas	*In situ*	AGV totales	↓	Guerra-Rivas *et al.* 2016
				N-NH_3	↓	
OU seco en polvo, 2, 4 y 6% MS	Paja de arroz	Búfalos	*In vitro* (*batch*)	Produccion de gas	↓	Foiklang *et al.* 2016
				Digestibilidad MS	↑	
				AGV totales	↑	
				Propionato	↑	
				Bacterias	↑	
				Protoozarios	↓	
OU 5, 10% MS TMR	Dieta 40:60 forraje-concentrado	Ovejas	*In vivo*	Ac. linoleico	↑	Manso *et al.* 2016
				AGS	=	
				AGI	=	
OU seco 10, 20 y 30%	Dieta forrajera, alfalfa sustitución parcial con OU	Corderos engorde	*In vivo*	Ganancia de peso	↓	Calderón-Cortés *et al.* 2018
				Calidad de la canal	=	
OU 0, 5 y 10%	Dieta 50:50 forraje-concentrado	Corderos	*In vivo*	Ganancia de peso	↑	Zhao *et al.* 2018
				Capacidad antioxidante carne	↑	
				Nivel ROS	↓	
OU ensilado	Dieta cereales	Corderos	*In vivo*	Peso de la canal	↑	Kafantaris *et al.* 2018
				C 20:0 Carne	↑	
				cis11,14,20:0 n-6	↑	
				20:5 n-3	↑	
				22:6 n-	↑	
OU seco ensilado	Dieta forrajera	Bovinos engorde	*In vivo*	Ganancia de peso	↓	Caetano *et al.* 2019
				Conversion alimenticia	↑	
				Consumo energía	↑	

Inclusión	Tipo de dieta	Especie	Ensayo	Resultados		Referencias
				Producción CH_4	↓	
OU 10%, semilla uva 5%	Concentrado y paja de alfalfa	Ovejas lactantes y crías	*In vivo*	Acidos grasos saturados en leche	↑	Resconi *et al.* 2018
				PUFA	=	
				C18:2 n-6 carne	↑	
OU seco 5, 10, 15 y 20% MS	Dieta cereales	Corderos	*In vivo*	Ganancia de peso	↑	Chikwanha *et al.* 2019
				Consumo MS	↑	
				Peso canal	↑	
				Rentabilidad	↑	
OU seco 4%	TMR	Ovejas	*In vivo*	Consumo MS	↓	Nudda *et al.* 2019
				Producción láctea	↑	
				Grasa y proteina leche	↓	
OU seco 10%	Dieta cereales	Terneros	*In vivo*	Acido linoleico carne	↑	Ianni *et al.* 2019
				Estabilidad oxidativa	↑	
OU seco reemplazo 33% forraje	Forraje y concentrado	Vacas lecheras	*In vivo*	Produccion láctea	↓	Moate *et al.* 2020
				C 18:0	↑	
				CLA	↑	
				Prod y rend CH_4	↓	
Ensilaje de OU 10, 20 y 30% MS	Dieta 55:45 forraje-concentrado	Corderos	*In vivo*	Desempeño productivo	=	Massaro *et al.* 2021
				Calidad canal	=	
				Calidad carne	=	
OU 1, 2% MS	Dieta forrajera	Ovejas	*In vivo*	Digestibilidad proteina	↑	Juráček *et al.* 2021
				Digestibilidad FDN	↑	
				Digestibilidad FDA	↑	
Ensilaje de OU, sustituyendo 50, 75 y 100% de ensilaje de maíz	Dieta 50:50 forraje-concentrado	Corderos	*In vivo*	Lípidos carne	↑	Flores *et al.* 2021
				C 18:1 t 11	↑	
				C18:2 n-6	↑	
				C18:2 c9, t 11	↑	
				MUFA	↓	
				PUFA	↑	
				n6/n3	↑	
				Rancidez oxidativa	↑	
OU 116 g/vaca/día	TMR	Vacas gestantes	*In vivo*	Nutrientes en calostro	=	Rolinec *et al.* 2021
				Perfil lipídico calostro	=	
				Celulas somáticas calostro y leche	↓	

Inclusión	Tipo de dieta	Especie	Ensayo	Resultados		Referencias
OU seco, 15 y 30% MS	Grano de cebada laminado	Bovinos finalización	*In vivo*	Digestibilidad PC	↓	Vinyard *et al.* 2021
				Digestibilidad de FDN	↓	
				AGV totales	=	
				$N\text{-}NH_3$ (15% MS)	↓	
				CLA (15% MS)	↓	
OU 5, 10% MS	Dieta 40:60 forraje-concentrado	Ovejas lactancia y crías	*In vivo*	Oxidación lípidos	↓	Vieira *et al.* 2022
				Contenidos metmioglobina	↓	
				Crecimiento enterobacterias	↓	
OU 20%	Dieta 55:45 forraje:concentrado	Ovejas	*In vivo*	Consumo MS	↑	Wu *et al.* 2022
				N fecal	↑	
				Parásitos gastroentéricos	=	

Fuente: elaboración propia

1.3.1 POTENCIAL ANTIMETANOGÉNICO DEL ORUJO DE UVA

El potencial antimetanogénico del OU se ha atribuido a su contenido de TC, aunque los mecanismos a través de los cuales los taninos disminuyen la producción de CH_4 no son claros y se ha propuesto una acción sinérgica entre los diferentes constituyentes del orujo como la lignina y la grasa (Hixson *et al.* 2016; Moate *et al.* 2020). La eficacia del OU para reducir el CH_4, sin impactar negativamente la productividad, depende de los contenidos de EM del OU en relación con el ingrediente de la dieta al que sustituye (Black *et al.* 2021). Vacas lecheras en producción, alimentadas con raciones que incluían el 25% de OU seco o ensilado, presentaron reducciones entre el 18% y 23% en la producción de CH_4 (CH_4 g/kg de MS ingerida), aunque la inclusión de OU seco también redujo intensidad de producción de CH_4 por producto final (g/kg de leche) (Moate *et al.* 2014). De acuerdo con estos autores, esta reducción de CH_4 se debe a la acción sinérgica

de los contenidos de taninos, grasas, lignina y ácido tartárico en el OU. Hixson *et al.* (2018) demostraron que el potencial antimetanogénico del OU es resultado de los efectos combinados de los contenidos de grasa, los cuales se asocian con la disminución del volumen total de gas y de la producción de ácidos grasos volátiles, y los contenidos de TC los cuales reducen el porcentaje de CH_4. La estructura de los taninos incide en su potencial antimetanogénico, taninos de menor tamaño y fácilmente extraíbles son más eficaces para reducir la producción de CH_4, sin disminuir la producción total de gas (Hixson *et al.* 2018). La tabla 1.6 presenta los resultados de los efectos antimetanogénicos de diferentes estudios realizados en el periodo 2012-2022.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la actividad antimetanogénica de los TC. Su capacidad de precipitación de macromoléculas (Desrues *et al.* 2017) y su comportamiento antioxidante (Aboagye y Beauchemin, 2019) han sido sugeridos como responsables de la reducción de la metanogénesis. Los TC forman complejos con los compuestos lignocelulósicos, previniendo la fermentación de la fibra y con ello una reducción en la formación de CH_4 (Huyen *et al.* 2016). De otra parte, la inclusión de OU puede mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes en los rumiantes, reduciendo las pérdidas metabólicas de energía que se producirían a través de las emisiones de CH_4 (Hristov *et al.* 2013). Los TC inhiben directamente las poblaciones metanogénicas ruminales (Saminathan *et al.* 2016) o dificultan la simbiosis metanógeno-protozoo (Nauman *et al.* 2017). Se ha establecido que el aceite de semilla de uva, constituido mayoritariamente por ácido linoleico y ácido oleico, contribuye significativamente a la reducción en la producción de CH_4 entérico (Ibrahim *et al.* 2018),

aunque también se ha establecido que las catequinas (Becker, 2014) y el ácido tartárico (Sirohi *et al.* 2012) contribuirían a este efecto.

Aunque no se han esclarecido totalmente los mecanismos por los cuales los taninos influyen en la metanogénesis y modifican el perfil de los AGV durante la fermentación ruminal (Verma *et al.* 2021), se ha demostrado que, sus efectos en la nutrición de rumiantes dependen del tipo de tanino, su estructura, la dosis suministrada, y la morfología y fisiología del rumen (Min *et al.* 2020).

Tabla 1.6. Potencial antimetanogénico del orujo de uva

Inclusión	Tipo de dieta	Especie	Ensayo	Resultados		Referencias
OU 27% MS	Forraje, concentrado y OU	Bovinos leche	*In vivo*	CH_4 20%	⇓	Moate *et al.* 2014
OU diferentes orígenes, seco, ensilado, fresco	OU solo	Vacas	*In vitro*	OU seco y ensilado, CH_4 (mL/g MS) 11 y 21%	⇓	Russo *et al.* 2017
OU seco diferentes orígenes 30%	Concentrado comercial	Carneros	*In vitro*	CH_4 (mL/g MS) 12-18%	⇓	Hixson *et al.* 2018
OU ensilado	Dieta forrajera	Bovinos	*In vivo*	CH_4 (g/día) 14%	⇓	Caetano *et al.* 2019
OU ensilado	Forraje, Concentrado	Vacas	*In vitro*	CH_4 (mmol/L), 9-15%	⇓	Mousa *et al.* 2019
OU diferentes fuentes	OU solo	Ovejas	*In vitro*	CH_4 (mL) 5.6-16.1		Atalay, 2020
OU 10%	TMR	Ovejas	*In vivo*	CH_4/kg MS CH_4/kg leche 21%	= ⇓	Buffa *et al.* 2020
OU seco rojo y blanco	Forraje, OU	Vacas	*In vivo*	CH_4 (g/día) 15% Rendimiento CH_4 (g/kg MSi) 16%	⇓ ⇓	Moate *et al.* 2020
	OU solo	Ovejas	*In vitro*	CH_4 (mL/g MS) 3.7-9.6	⇓	Barraso *et al.* 2021

Inclusión	Tipo de dieta	Especie	Ensayo	Resultados		Referencias
OU diferentes fuentes						
OU ensilado	OU solo	Carneros	*In vitro*	CH_4 (mL) solo 2.27 +Polietilen glicol 3.43	⇓	Fitri *et al.* 2021
OU 15, 30 y 50% en sustitución de heno	Heno	Vacas	*In vitro*	CH_4 (mL/g MS) 7-12%	⇓	Giller *et al.* 2021

Fuente: elaboración propia

1.3.2 ORUJO DE UVA Y METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Los TC presentes en el OU pueden alterar el metabolismo del nitrógeno, efecto potencialmente benéfico desde el punto de vista ambiental, particularmente sistemas en los cuales los animales consumen dietas con proteínas altamente degradables en el rumen. El contenido de taninos se asocia a un incremento en la utilización de la proteína de la dieta para rumiantes (Makkar, 2003). Los TC forman complejos insolubles con las proteínas uniéndose a la superficie de la proteína y formando una capa que conduce a su precipitación (Zeller, 2019), estos complejos son dependientes del pH del medio, regularmente son formados en medios con pH de 5.5 a 7.0, común en el rumen, reduciendo la degradación microbiana de las proteínas. Los complejos tanino-proteína se disocian en el pH ácido del abomaso (pH 2.5 a 3.5) y en las condiciones del intestino delgado distal (pH 7.5) lo cual libera la proteína para su digestión y absorción (Hagerman, 2012). Un extracto de taninos de OU en estudios *in vitro* e *in sacco* redujo la digestibilidad proteica ruminal de harina de soya e incrementó la digestibilidad post-ruminal de la misma,

proporcionalmente a su nivel de inclusión en la dieta (Alipour y Rouzbehan, 2010). El suministro de OU (7.5% MS) a ovejas redujo en un 33% el nitrógeno amoniacal ruminal ($N\text{-}NH_3$) como resultado de una alta proporción de proteína unida a la fibra detergente ácida del OU y a la presencia de compuestos fenólicos (Guerra-Rivas *et al.* 2016). De igual forma, el suministro de OU en reemplazo parcial del concentrado en dietas forrajeras, generó una mayor retención de nitrógeno, menor excreción del nitrógeno dietario en heces y menores concentraciones de nitrógeno plasmático (Foiklang *et al.* 2016). La sustitución parcial de ensilaje por OU seco y ensilado (15% MS) en vaquillas de engorda generó reducciones de las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ cercanas al 15%, atribuibles a los contenidos de TC del OU (Ream *et al.* 2021). Los compuestos polifenólicos reducen la degradación de la proteína en el rumen, además de la formación del complejo tanino-proteína, inhibiendo el crecimiento y la actividad de los microorganismos ruminales, y reduciendo la actividad de las enzimas microbianas (Vasta *et al.* 2019). La reducción en $N\text{-}NH_3$ debería resultar en una disminución de la excreción urinaria de N y N ureico, y una mayor partición de N hacia las heces, lo cual podría ser benéfico cuando se suministran dietas con altos contenidos de proteína degradable en el rumen (Greenwood *et al.* 2012). Sin embargo, los métodos de secado y conservación del OU son algunos de los factores que podrían afectar la eficacia de los taninos para modular el metabolismo del nitrógeno. Temperaturas de secado superiores a 60 ºC incrementan la formación de complejos tanino-fibra en el OU (Girard *et al.* 2018; Taşeri *et al.* 2018).

1.4 EFECTOS DEL ORUJO DE UVA SOBRE LA SALUD ANIMAL

Los metabolitos secundarios contenidos en el OU tienen efectos positivos sobre la salud humana y animal (Ivanišová *et al.* 2019). Se ha demostrado la actividad del OU sobre bacterias patogénicas, virus, toxinas de hongos y parásitos (Friedman 2014), además de una reconocida actividad antioxidante por sus contenidos de fibra dietética antioxidante, polifenoles extraíbles y no extraíbles. Flavonoides y TC actúan como eliminadores de radicales libres, promueven la vasodilatación, inhiben enzimas como la fosfolipasa, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, y actúan como reductores en los procesos de peroxidación lipídica (Molosse *et al.* 2021). Los antioxidantes dietarios mejoran la salud y el bienestar de los animales, además de incrementar las cualidades nutricionales, organolépticas y de conservación de los productos animales (Salami *et al.* 2016). La suplementación con harina de OU al 2% a ovejas lecheras en condiciones de estrés calórico redujo la respuesta inflamatoria, mejoró la calidad de la leche, el recuento de células somáticas y la peroxidación lipídica (Alba *et al.* 2019). Por otra parte, se ha demostrado que inclusiones de OU hasta el 20% MS en dietas de rumiantes reduce la aparición de acidosis y paraqueratosis (Salami *et al.* 2016). Adicionalmente, los TC del OU poseen reconocida actividad anti timpanismo, aunque los mecanismos no están del todo claros, la reducción de la incidencia de timpanismo es en parte el resultado de la precipitación de las proteínas durante la masticación y la rumia, así como de la reducción de la actividad microbiana, la formación de biopelículas y de la producción de gas ruminal (Correddu *et al.* 2015).

1.5 EFECTOS DEL ORUJO DE UVA SOBRE LA CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL

Los compuestos fenólicos afectan el metabolismo ruminal y la biohidrogenación afectando el perfil lipídico de la carne y la leche, por tanto, la incorporación de OU en dietas de rumiantes puede modificar los parámetros que determinan la calidad de los productos finales. Los taninos presentes en el OU retrasan la oxidación lipídica y proteica de la carne debido a su actividad antioxidante. Se ha demostrado cambios en los niveles de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la carne y leche, así como su capacidad antioxidante en relación con el nivel de inclusión de orujo en la dieta (Moate *et al.* 2014, Santos *et al.* 2014). Gómez-Cortés *et al.* (2018) reportaron mayor capacidad de retención de agua en la carne, por la inclusión de OU en dietas para rumiantes, por efecto de los polifenoles que tienen la capacidad de evitar la pérdida de la integridad de las membranas y los enlaces de las proteínas, inhibiendo la oxidación de la carne. La inclusión de ensilaje de OU en reemplazo del ensilaje de maíz en la alimentación de corderos modificó la fracción lipídica, el perfil de ácidos grasos, y los parámetros oxidativos de la carne, sin afectar negativamente los parámetros sensoriales (Flores *et al.* 2021).

1.6 UVA VARIEDAD PAÍS

La industria vitivinícola ha sido fundamental para el desarrollo económico del sector agrícola chileno, y se desarrolló sobre la base de cepas traídas durante la colonia. Las cepas ancestrales fueron dominantes hasta el siglo pasado, incluyendo la variedad País, la cual a pesar de ser la cuarta más plantada actualmente, ha sido reemplazada por las cepas "nobles", pasando de ser la de mayor área cultivada a contar con apenas cerca de 10.000 hectáreas, concentradas en las regiones de Maule, Biobío y Ñuble (SAG, 2019).

Pese a constituirse en patrimonio cultural de Chile (Odepa, 2019), la cepa País ha perdido participación en la producción nacional pues su vino se caracteriza por su dureza y desequilibrio (Eriz et al., 2011), características que han reducido su precio en la industria vinícola, reduciendo su rentabilidad, afectando la calidad de vida de los pequeños productores. La variedad País tiene una alta capacidad de adaptación a condiciones de sequía, resistencia a plagas y enfermedades, lo que favorecería su persistencia en condiciones de CC; además potencialmente podría insertarse en el rubro de los vinos con denominación de origen (Odepa, 2019). La comercialización de la uva País en general, se realiza directamente de los pequeños productores a bodegas locales y grandes viñas, en forma directa o a través de corredores. Los productores, cuando poseen más de 10 has, vinifican su producción, aunque la uva País y el vino derivado de esta son utilizados por las grandes viñas para elaborar vinos de consumo nacional, siendo el 70% de la producción destinado a la mezcla con Cabernet. Por esta razón, una parte importante de la producción

es comprada por las grandes viñas que abastecen el mercado nacional (Carrasco, 2014). Chile actualmente cuenta con importantes iniciativas públicas y privadas que buscan dar valor agregado a las uvas ancestrales, lo cual podría incrementar su producción a futuro. La información disponible sobre la uva País se centra en la caracterización, extracción y aplicación de sus compuestos bioactivos, específicamente proantocianidinas PA de interés para la salud humana (Aguilar *et al.* 2016, Figueroa *et al.* 2020). La información sobre su composición química o residuos como el orujo es limitada. Uvas y zumos de la cepa País presentan una amplia variabilidad, con contenidos de polifenoles totales que oscilan entre 790-1929 mg GAE/L, o 10-50 mg GAE/g, y una capacidad antioxidante entre 5.5-55 mmol equivalente de trolox/L (Lutz *et al.* 2012, Aguilar *et al.* 2018, Ide *et al.* 2021). Figueroa *et al.* (2020) caracterizaron un extracto polifenólico de semillas de uva País, reportando contenidos de TC de 329.5 mg equivalentes de catequina/g de extracto, las cuales presentaban un grado de polimerización media de 9.2, y epicatequina y epicatequina gallato como los compuestos más abundantes. Estos autores reportaron un mayor porcentaje (58.9%) de moléculas de bajo peso molecular (800-9263 g/mol), seguido (25%) de moléculas de peso medio, y un 15% de moléculas de mayor peso (13944-21928 g/mol). Actualmente no existe literatura disponible sobre el uso de OU País en alimentación animal.

1.7 ESTRATEGIAS DE VALORIZACIÓN DEL ORUJO DE UVA

En la industria alimenticia o subproductos de la uva han sido evaluados como antioxidantes naturales, preservantes, estabilizadores de color y texturizadores de productos cárnicos (Beres *et al.* 2017). Una estrategia de valorización de este recurso es la recuperación de compuestos fenólicos y su aplicación en la producción funcional de alimentos, que puede ser realizada simultáneamente a la extracción de aceite de semilla de uva. Este campo prometedor ha generado avances tecnológicos y desarrollo de procedimientos alternativos para la recuperación de estos compuestos de forma más rápida y ecológica (Kalli *et al.* 2018). En la alimentación animal el OU ha sido usado como ingrediente, ya sea fresco, desecado o ensilado. Su uso como aditivo (extractos polifenólicos o ricos en taninos) es más escaso y se ha enfocado a la conservación de productos (carnes, embutidos y lácteos) debido a sus propiedades antimicrobianas (Friedman, 2014). Recientemente se ha evaluado el uso de antioxidantes derivados del OU para el enriquecimiento del queso, a fin de obtener un alimento funcional (Marchiani *et al.* 2016).

La valorización de subproductos agroindustriales ofrece alternativas para minimizar el impacto ambiental de las actividades productivas e incrementar la rentabilidad a través de la comercialización de compuestos bioactivos. Las tecnologías para extraer compuestos de alto valor de los residuos de frutas varían desde extracción

convencional sólido/líquido hasta extracciones sub/supercríticas, asistidas por ultrasonidos y enzimas (Alexandre *et al.* 2018). Las técnicas de extracción convencionales de compuestos bioactivos se basan en la eficiencia de extracción de diferentes solventes, siendo las más comunes la extracción sólido-líquido por agitación mecánica y extracción Soxhlet, con soluciones etanólicas o metanólicas como solventes; maceración e hidrodestilación (Da Porto y Natolino, 2018). Sin embargo, estos métodos presentan debilidades relacionadas con el tiempo de extracción, la baja selectividad, el costo, las pérdidas por evaporación y la toxicidad del solvente, la degradación de los compuestos termolábiles y los impactos ambientales (Galanakis *et al.* 2013). Para superar estas limitaciones, ya se han desarrollados métodos alternativos, como la extracción asistida por microondas, la cual acelera la transferencia de energía, reduce el gradiente térmico, y reduce significativamente el tiempo de extracción (Esquivel-Hernández *et al.* 2017).

Los múltiples beneficios de los polifenoles y taninos sobre la fisiología y productividad animal (Ianni y Martino, 2020), además de la reducción de impactos ambientales y costos de eliminación, hacen que la recuperación de estos compuestos bioactivos desde los residuos, se convierta en una estrategia atractiva para el desarrollo de nuevos productos y la agregación de valor (Fraga-Corral *et al.* 2021).

CAPITULO 2

COMPOSICIÓN QUÍMICA, PERFIL LIPÍDICO, PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL DEL ORUJO DE UVA PAÍS Y SU EXTRACTO POLIFENÓLICO ESTANDARIZADO

2.1 EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE SECADO DE ORUJO DE UVA PAÍS (*VITIS VINIFERA* L.) SOBRE LOS CONTENIDOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO EN CONDICIONES *IN VITRO*

2.1.1 Resumen

Este estudió evaluó los efectos de las condiciones de secado (liofilización y secado en horno a 40ºC durante 72 h y 60ºC durante 48 h) sobre la composición química, compuestos bioactivos, capacidad antioxidante, parámetros de fermentación ruminal y producción de CH_4 de OU País. Adicionalmente, se utilizó un sistema de fermentación *in vitro* (batch) para evaluar los parámetros de fermentación ruminal y la producción de CH_4 del OU País bajo estas condiciones de secado. Los contenidos de fenólicos, de TC, así como la capacidad antioxidante del OU País fueron afectados por las condiciones de secado. El OU País liofilizado presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos (24.2 GAE/g MS), pero el OU País secado en horno a 60ºC durante 48-h mostró el mayor contenido de TC (68.9 mg de catequina equivalente/g MS). Los contenidos de cenizas, extracto etéreo y carbohidratos no fibrosos fueron afectados por las condiciones de secado, pero no la fibra expresada como FDN o FDA. El secado de OU en horno a 60°C durante 48 horas redujo la desaparición *in vitro* de la materia seca y la producción de gas, pero también generó una menor producción y rendimiento de CH_4. Estos resultados sugieren

que estas condiciones de secado permiten conservar el valor nutricional del OU País (compuestos fenólicos, grasa y fibra), prolongar su vida útil y, su uso como ingrediente en dietas para rumiantes con potenciales efectos positivos sobre las emisiones de CH_4 entérico.

Palabras clave: subproductos del vino, compuestos bioactivos, metano, ganado

2.1.2 Introducción

Las grandes cantidades de residuos generados por las industrias agrícola y alimentaria pueden ser utilizados como materia prima para obtener productos de alto valor agregado promoviendo la sostenibilidad productiva. En la alimentación animal el uso de subproductos reduce los costos y preserva el rendimiento productivo (Lourenco *et al.* 2016), ofreciendo una solución para reducir los impactos ambientales asociados a la industria de transformación, como las emisiones de GEI y la contaminación del agua (Adejumo y Adebiyi, 2020). La gran variabilidad en los contenidos de humedad, nutrientes y compuestos bioactivos, así como la estacionalidad de la producción y las necesidades de transporte y almacenamiento, dificultan el uso de estos subproductos como ingredientes usuales en las raciones animales.

El orujo de uva (OU), subproducto constituido por semillas, hollejos y pulpa, resultado del proceso de elaboración del vino, representa el 20-25% del peso de la uva (Dávila *et al.* 2017) y posee compuestos fenólicos con reconocidas propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Granda y de Pascual-Teresa, 2018). La inadecuada disposición final del OU representa un problema ambiental y económico para la industria vitivinícola (Beres *et al.* 2017). Los contenidos de compuestos bioactivos, efectos potenciales sobre la metanogénesis, la digestión de la proteína, así como los contenidos de fibra y energía metabolizable, hacen del OU un subproducto valioso para la alimentación de rumiantes. La composición nutricional, y los efectos del OU sobre la fermentación ruminal varían considerablemente según su fuente y tipo (Russo *et al.* 2017).

Sin embargo, debido a su alto contenido de humedad y a la estacionalidad de la producción es un producto altamente perecible, por lo cual el proceso de deshidratación es esencial para prolongar su vida útil manteniendo sus propiedades (Carmona-Jiménez *et al.* 2018).

La investigación sobre el uso de OU en la alimentación de rumiantes se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, demostrando que los valores nutricionales y efectos sobre los parámetros de fermentación ruminal (AGV, producción de gas y CH_4) varían significativamente según el origen y el tipo de OU (Hixson *et al.* 2016, Russo *et al.* 2017, Chikwanha *et al.* 2018). Una evaluación adecuada de los diversos tipos de OU permitiría establecer su potencial de uso en la alimentación de rumiantes.

Chile se ubicó como el octavo productor mundial de vino en 2020, con una producción de 10.3 millones de hectolitros (OIV, 2021), de la cual se derivan grandes cantidades de OU, generando un importante desafío de manejo. La cepa ancestral País (*Vitis vinifera* L.), conocida por su rusticidad y resistencia a plagas, así como por tener un alto contenido de TC, es la cuarta uva más plantada en Chile (Ide *et al.* 2021). Actualmente es objeto de múltiples iniciativas públicas y privadas que pretenden su recuperación, dado su valor patrimonial (Gutiérrez-Gamboa *et al.* 2020).

La información disponible sobre la uva País se centra en la extracción y aplicación de sus compuestos bioactivos, particularmente TC para la salud humana (Aguilar *et al.* 2016, Figueroa *et al.* 2020). Información sobre la composición del OU País y su

fermentación ruminal es necesaria para considerar su uso en la alimentación de rumiantes, por lo cual el objetivo de este estudio fue comparar los efectos de la liofilización frente al secado en horno de aire forzado a 40 ºC por 72 h y a 60 ºC por 48h sobre la composición química, los contenidos de compuestos bioactivos, los parámetros de fermentación ruminal y la producción de CH_4 de OU País, utilizando un sistema de fermentación ruminal discontinuo *in vitro* (*batch*).

2.1.3 Materiales y métodos

Reactivos

El carbonato de sodio (Na_2CO_3) y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (reactivo DPPH) fueron comprados a Sigma Aldrich (St. Louis, USA). El reactivo Folin Ciocalteu, el n-hexano, el etanol, el metanol calidad HPLC, el ácido clorhídrico, el ácido gálico, el hidrato de catequina (+), el 4-dimetilaminocinamaldehído (DMAC) y el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania).

Orujo de uva

Se obtuvieron 10 kg de orujo fresco (piel, semillas y pulpa) de la variedad local de uva tinta País (*Vitis vinifera* L) del valle del Itata, vendimia de 2019; del laboratorio de vinificación de la Universidad de Concepción (Ñuble-Chile).

Condiciones de secado

Se seleccionaron tres submuestras, y se asignaron al azar a un tratamiento. Una muestra fue liofilizada a -20 ºC durante 24 h (OU_C) que fue considerada como control para todos los análisis. La segunda muestra fue secada utilizando un horno a 60 ºC por 48 h (OU_{60}) y la tercera fue secada en horno a 40 ºC por 72 h (OU_{40}) de acuerdo con Tseng y Zhao (2012). Las muestras fueron molidas a través de un tamiz de 2 mm (Molino de corte, Breuer, Temuco-Chile) y almacenadas a -20 ºC hasta su procesamiento.

Análisis químicos

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Nutrición Animal del departamento de Producción Animal (Universidad de Concepción, Chile). El OU País fue analizado acorde a los métodos descritos por la Association of Official Analytical Chemists, AOAC (AOAC, 1997). Los análisis fueron 930.15 para el contenido de materia seca (MS), 923.05 para ceniza total, 954.01 para proteína cruda (PC), 920.39 para extracto etéreo (EE) y el método enzimático-gravimétrico 973.18 para fibra detergente ácida (FDA). La fibra detergente neutra (FDN) se analizó según Mertens (2002) utilizando alfa amilasa termoestable (Ankom, Technology).

Nota: Los análisis químicos, análisis de CPT, y PA de los substratos y/o residuos de las fermentaciones *in vitro* en *batch* y Rusitec, que hacen parte integral de esta tesis fueron realizados con los métodos descritos en este capítulo, salvo que se indique alguna diferencia.

Extracción de compuestos fenólicos

Los análisis de compuestos bioactivos se realizaron en el Laboratorio de Síntesis y Biotransformación de Productos Naturales de la Universidad del Bio-Bío (Chillán). El OU se molió en un molinillo de café (1 min) hasta un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm. Previo a la extracción de polifenoles, el OU fue desengrasado usando un aparato soxleth con 300 mL de n-hexano como solvente, hasta agotamiento. Finalizada la extracción, se eliminó el n-hexano a una temperatura máxima de 40 °C mediante un evaporador rotatorio (Laborota 4000, Heidolph, Alemania). El OU desgrasado fue sometido a maceración en etanol acuoso al 80% en una proporción de 1:5 (g/mL), en un agitador orbital (100 rpm; Unimax 1010 Heidolph, Alemania) durante 1 h a temperatura ambiente de acuerdo con Milinčić et al. *et al.* (2021). El solvente fue extraído mediante un evaporador rotatorio (Laborota 4000, Heidolph, Alemania). La fracción polifenólica fue recuperada y almacenada a -80 ºC hasta su evaluación. El procedimiento se realizó por triplicado.

Determinación del contenido de polifenoles totales

Los contenidos de polifenoles totales (CPT) fueron determinados mediante ensayo colorimétrico basado en el reactivo de Folin-Ciocalteau, según Trujillo-Mayol *et al.* (2019), después de revelar el color, se leyó la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA). Los

resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico/g de OU MS (eq-gm GA/g MS).

Determinación del contenido total de proantocianidinas

Los contenidos totales de proantocianidinas (PAC) se determinaron mediante el método DMAC (Payne *et al.* 2010). En una microplaca de 96 pocillos se mezclaron 70 µL de una dilución del extracto y 210 µL de solución de DMAC (0.1 mg/mL), tras 25 min de incubación se leyó la absorbancia a 640 nm utilizando un espectrofotómetro (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA). Los contenidos de PA se expresaron como eq-g de catequina por g de OU MS (mg CatE/g MS).

Determinación del contenido total de antocianos

El contenido total de antocianos (CAT) se determinó mediante el método de pH diferencial. Las muestras se diluyeron en soluciones tampón de pH 1.0 y pH 4.5. Las absorbancias se midieron a 520 nm y 700 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Vis Orion Aqua-Mate 8000 (Madrid, España) y los resultados se expresaron en mg de cianidina 3-glucósido/100 g de OU (mg cianidina 3-glucósido/100 OU MS).

Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo de barrido de radicales de DPPH según Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Una submuestra (20 µL) de una segunda dilución del extracto de OU fue mezclada en una microplaca de 96 pocillos, con 280 µL de DPPH metanólico (absorbancia 1.1), la microplaca se mantuvo en la oscuridad durante 20 min previo a ser leída, la absorbancia se midió a 517 nm utilizando un espectrofotómetro (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA). Los resultados se expresaron como eq-µg Trolox por g de materia seca (µg Trolox/g MS).

Fermentación ruminal *in vitro*

Todos los procedimientos utilizados en este experimento y en los estudios que involucraron fermentaciones *in vitro* fueron realizados de acuerdo con las normas del Comité de ética y bienestar animal de la Universidad de Concepción (CBE-08-2021) y fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición y Sistemas Ganaderos de la Universidad de Concepción (Chillán, Chile).

Dos vacas fistuladas fueron alimentadas durante dos semanas antes de la inoculación con una mezcla de heno, maíz y minerales, y tuvieron acceso a agua y pastos *ad libitum*. Se obtuvieron muestras de fluido ruminal de varias zonas del rumen, 2 h después de la alimentación de la mañana, el fluido ruminal se filtró a través de 4 capas de

gasa y se transportó al laboratorio en termos precalentados (39 ºC) para preparar el inóculo, una mezcla de fluido ruminal y buffer (Menke *et al.* 1979) en proporción 1:3 v/v.

El OU País se molió a 2 mm (molino de grano Breuer, Temuco, Chile) y 500 mg de las fracciones/alícuotas obtenidas por cada método de secado se depositaron en bolsas filtrantes Ankom® F57 (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA), las cuales fueron selladas y depositadas en botellas ámbar de 50 mL en la que se dispensaron 25 mL de inóculo. Luego las botellas fueron selladas con tapones de caucho y se incubaron (Incubadora Form Series II 3110, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) durante 48 h a 39°C, en un agitador orbital (Heidolph Unimax, Alemania) a 90 oscilaciones/min.

La producción de gas en cada botella se midió a las 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h de incubación, mediante la metodología de desplazamiento de agua (Fedorah y Hrudey, 1983). Previamente a la medición se recogió una muestra de 15 mL para la determinación de CH_4 (12, 24 y 48 h). El contenido de CH_4 se midió según Vera *et al.* (2021) utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EE.UU.), provisto de una columna capilar (GS-CarbonPLOT, Agilent Technologies, Italia 30m, 0.32mm, 3.00µm) y acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD). El flujo de gas portador (Helio) se ajustó a 20 mL/min, y las temperaturas fueron de 35 ºC para la columna, 185 ºC para el inyector, y 150 ºC para el TCD.

El pH del medio de cultivo se comprobó con un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star A121 pH Portable Meter, USA) a las 24 h y a las 48 h de incubación. Una vez terminada la incubación, las bolsas Ankom®-F57 se lavaron y secaron a 55°C durante 48 h para determinar la desaparición *in vitro* de la MS (DIVMS). Los residuos de incubación se analizaron para determinar los contenidos de FDN como se describió en el primer experimento. Al principio de la incubación se recogieron muestras de inóculo de 1.5 mL, al final de la incubación se tomaron muestras de fluido de cultivo de cada frasco para determinar el N-NH_3. Las muestras se mezclaron con 150 µL de ácido tricloroacético (0.65 p/v), se centrifugaron (14.000 x g durante 10 min a 4 ºC) y el sobrenadante se utilizó para medir las concentraciones de N-NH_3, con un espectrofotómetro UV-VIS (Spectroquant Pharo 300, Merck KGaA, Alemania) a 625 nm según el método de Berthelot modificado por Rhine *et al.* (1998).

Cada muestra de OU se incubó en tres réplicas técnicas y tres corridas (réplicas estadísticas) en semanas consecutivas con seis momentos de muestreo (2, 4, 6, 12, 24 y 48 h). Para este estudio se utilizaron 216 frascos en total [{(3 muestras de OU × 3 réplicas) + 3 blancos} × 6 tiempos de muestreo × 3 corridas (réplica estadística)].

Cálculos

La energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) fue calculada utilizando los contenidos de FC y EE (g/kg MS) y la producción de gas (PG) a las 24 h de incubación (en mL por 500 mg de MS incubada) según Menke y Steingass (1988). La concentración de ácidos

grasos de cadena corta (AGCC) se calculó según Getachew *et al.* (2000) sobre la base de la PG a las 24 h, mediante la ecuación:

$$AGCC\ (mmol/200\ mg\ MS) = 0.0222 \times PG - 0.00425$$

donde: PG es la producción neta de gas a las 24 h (mL/200 mg MS).

Los resultados de los parámetros de la cinética de la DIVMS se ajustaron utilizando la ecuación no lineal de Gompertz (Lavrenčič *et al.* 1997) y los resultados de los parámetros de la cinética de PG y CH_4 se ajustaron utilizando la ecuación no lineal de Gompertz (Schofield *et al.* 1994). El gas neto (mL) o CH_4 (mg) en cada tiempo de muestreo, dividido por g de MS degradada (DMD), se presenta como rendimientos de gas y CH_4.

Análisis estadístico

Los análisis químicos se realizaron por triplicado y los datos se presentaron en base seca como la media ± desviación estándar. Los efectos del método de secado se analizaron en relación con las diferencias significativas mediante las pruebas ANOVA y Tukey para comparación de medias con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$), los resultados se procesaron con el software Statgraphics Centurion XVI.I (Rockville, USA).

Los datos de la fermentación in vitro fueron analizados mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para abordar diferencias significativas. Los resultados de los parámetros de fermentación *in vitro*, producción de gas y CH_4 se analizaron en un diseño de bloques completos al azar:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde: Y_{ij} es cada observación; μ es la media global de las observaciones; αi es la muestra de OU; β_j es la incubación; y εij es el error residual. Para todos los análisis el nivel de significancia estadística del efecto se definió como $p < 0.05$. Los análisis se realizaron usando el software Stata Ver. 15.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, Estados Unidos).

2.1.4 Resultados

Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de OU País bajo distintas condiciones de secado

Las condiciones de secado afectaron el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del OU País (Tabla 2.1.1). Con la excepción de los PAC, los contenidos de compuestos bioactivos fueron menores en el OU País secado en horno

comparado con el OU País liofilizado. Los valores de CPT de OU País liofilizado fueron de 24.24 eq-mg ácido gálico/g MS y la capacidad antioxidante de 148.4 eq-µg Trolox/g MS. El secado en horno redujo los valores de CPT (p = 0.001) en OU País en comparación con el OU liofilizado. Un menor contenido de CPT fue registrado para OU_{40} comparado con OU_{60}. Los contenidos de proantocianidinas (p = 0.043) en OU_{60} fueron superiores a los contenidos en OU liofilizado y OU_{40}. Los contenidos de antocianos fueron afectados por las condiciones de secado (p = 0.045), siendo menores para OU_{40} y para OU_{60} en comparación con OU liofilizado. La capacidad antioxidante de OU País se redujo por el secado en horno (p = 0.004), cuando se comparó con OU liofilizado, siendo mayor esta reducción para OU_{40} (26%) que para OU_{60} (7%).

Efectos de las condiciones de secado en la composición química del OU País

La materia seca fue afectada por las condiciones de secado (p <0.001), con mayor contenido de MS en OU secado en horno que en OU liofilizado (Tabla 2.1.1), aunque no se registraron diferencias entre los OU secados al horno. Los contenidos de cenizas, MO, EE y carbohidratos no fibrosos fueron afectados por las condiciones de secado. Los contenidos de cenizas (p = 0.003) fueron mayores para OU_{40} y OU_{60}, comparados con OU liofilizado, pero no hubo diferencias entre OU_{40} y OU_{60}. Los contenidos de extracto etéreo del OU País secado en horno estuvieron en el rango de 9.8-10% MS, siendo mayores 7 y 10% para OU_{40} y OU_{60}, respectivamente comparados con OU liofilizado (p = 0.042). Los carbohidratos no fibrosos fueron menores (p = 0.003) para OU_{40} y OU_{60} que para OU

liofilizado. No se registraron efectos sobre los contenidos de proteína de OU País, que estuvieron entre 9.6% y 9.9% MS. Asimismo, los contenidos de FDN, FDA y lignina de OU País no fueron afectados por las condiciones de secado, estos componentes representaron el 41%, 42% y 30% MS, respectivamente. No hubo efectos sobre la EM de OU País, cuyos contenidos estuvieron entre 9.6-10.2 MJ/kg MS.

Tabla 2.1.1. Composición química, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* del orujo de uva País bajo diferentes condiciones de secado (g/kg MS si no se indica algo diferente)

Item	OU_C	OU_{40}	OU_{60}	*p*-valor
Materia seca (g/kg materia fresca)	$922.4±6.25^B$	$937.4±3.26^A$	$944.5±4.32^A$	<0.001
Ceniza	$77.8±2.35^B$	$102.2±4.12^A$	$104.2±3.98^A$	0.003
Materia orgánica	$914.6±7.23^C$	$927.2±6.42^B$	$934.1±5.23^A$	<0.001
Proteína cruda	96.1±3.78	98.4±4.01	99.8±4.12	0.205
Extracto etéreo	$91.4±7.21^B$	$100.1±5.16^A$	$98.2±5.25^A$	0.042
Fibra detergente neutro	413.5±4.98	416.7±5.34	414.7±6.42	0.452
Fibra detergente ácido	418.5±8.25	420.1±7.35	422.1±7.86	0.149
Lignina	300.5±3.12	303.6±3.75	302.3±3.56	0.122
Carbohidratos no fibrosos[a]	$321.2±5.76^A$	$282.6±4.88^{AB}$	$290.8±4.45^B$	0.033
Glucosa	5.4±1.05	5.2±1.53	5.4±1.09	0.209
Sacarosa	6.5±1.29	6.1±0.95	6.6±1.12	0.913
CPT[b]	$24.2±1.66^A$	$14.6±1.50^C$	$18.4±1.77^B$	0.001
PA[c]	$58.8±6.49^B$	$52.2±9.82^C$	$68.9±5.01^A$	0.043
CAT[d]	$3.52±1.34^A$	$2.01±1.96^C$	$2.46±0.66^B$	0.045
DPPH[e]	$148.4±2.65^A$	$109.9±7.83^C$	$137.8±4.15^B$	0.004

Cada dato representa la media de tres replicas ± la desviación estándar.
[A-C]Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas de las medias ($p < 0.05$)
[a]Carbohidratos no fibrosos (CNF)= 100 –PC – EE – FDN – Cenizas
[b]CPT: Contenidos de polifenoles totales (eq-g AG/g MS)

[c]PA: Contenidos de proantocianidinas totales (eq-g CAT/g MS)
[d]CAT: Contenidos de antocianos totales (mg cianidina-3-glucosido/g MS)
[e]DPPH ensayo de eliminación de radicales para determinar la actividad antioxidante (eq-µg Trolox/g MS)

Parámetros de la fermentación ruminal y producción de CH_4 entérico de OU País bajo diferentes condiciones de secado

Cinética y parámetros de la fermentación ruminal *in vitro*

Los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* y de la cinética de la fermentación fueron afectados por las condiciones de secado del OU (Tabla 2.1.2). La fracción potencialmente degradable (*B*) fue mayor para el OU_C que para OU secado en horno ($p = 0.014$), mientras que la tasa de degradación relativa (*C*) ($p = 0.035$) y el factor de eficiencia microbiana (*A*) ($p = 0.021$) fueron mayores para el OU_{60} en comparación con OU_C. Las diferencias en la DIVMS entre los tratamientos fueron bajas al principio de la fermentación, pero después de 6-h hubo una marcada diferencia entre el OU secado en horno y el OU liofilizado. El secado en horno redujo en 16% y 14% la DIVMS a las 48 h para OU_{40} y OU_{60}, respectivamente, en comparación con OU_C. La PG a las 24 h ($p <0.001$) se redujo en 14 y 18% para OU_{40} y OU_{60}, respectivamente (Tabla 2.1.3). Resultados similares se registraron a las 12 h ($p <0.001$) y 48 h ($p <0.001$) de incubación.

Tabla 2.1.2. Efectos de las condiciones de secado del OU País sobre los parámetros de la cinética y la desaparición i*n vitro* de la materia seca (DIVMS) a las 48 h de incubación

Item[1]	**OU_C**	**OU_{40}**	**OU_{60}**	**EEM**[2]	***P-valor***
B	19.5^{A}	17.1^{B}	17.0^{B}	0.36	0.014
C	0.74^{B}	0.84^{AB}	1.39^{A}	0.122	0.035
A	0.633^{B}	0.706^{B}	1.318^{A}	0.0630	0.021
Desaparición *in vitro* de la materia seca (%)					
2 h	14.2^{A}	12.9^{B}	13.7^{AB}	0.60	0.028
4 h	14.8^{A}	13.3^{B}	14.3^{AB}	0.42	0.039
6 h	16.0^{A}	14.2^{B}	14.2^{B}	0.35	0.002
12 h	17.1^{A}	15.8^{B}	15.2^{B}	0.27	< 0.001
24 h	20.7^{A}	17.7^{B}	17.0^{B}	0.40	< 0.001
48 h	24.4^{A}	20.6^{B}	21.1^{B}	0.42	< 0.001

[A-B]Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas de las medias ($p < 0.05$)
[1]B = fracción potencialmente degradable (%); C = tasa de degradación relativa (/h); A = factor de eficiencia microbiana
[2] Error estándar de la media

La producción asintótica de CH_4 (p = 0.018) y la fase lag (p = 0.017) fueron menores para el OU_{60} que para OU_{40} y OU_C. La producción de CH_4 a las 24 h (p = 0.017) y a las 48 h (p <0.001) fueron 23% y 16% más bajas para OU_{60} que para OU_C. No se registraron diferencias entre OU_{40} y OU_C. El rendimiento de CH_4 de OU_{60} fue 43% menor a las 6 h (p <0.001), 31% a las 24 h (p = 0.016) y un 13% menor a las 48 h (p = 0.001) comparado con OU_C. El porcentaje de CH_4 a las 24 h (p <0.001) y a las 48 h (p <0.001) de incubación fue menor para OU_{60} comparado con OU_C. No se registraron diferencias entre OU_{40} y OU_{60}.

Tabla 2.1.3. Efectos de las condiciones de secado de OU País sobre la cinética y producción de gas, CH_4 y rendimiento de CH_4 a las 48 h de fermentación *in vitro*.

Ítem[1]	**OU_C**	**OU_{40}**	**OU_{60}**	**EEM**[2]	***P-valor***
Parámetros de la cinética de producción de gas					
b	65.4^{B}	58.5^{A}	59.7^{A}	0.85	0.016
c	0.1	0.1	0.1	0.01	0.812
L	0.8	0.6	0.6	0.15	0.613
Producción de gas (mL/g MS incubada)					
2 h	10.0	9.6	10.2	0.70	0.854
4 h	20.3^{A}	16.8^{B}	18.4^{AB}	0.74	0.010
6 h	20.8^{A}	18.9^{B}	19.4^{B}	0.36	0.004
12 h	36.2	34.9	35.8	2.77	0.992
24 h	54.3^{A}	48.5^{B}	50.0^{AB}	1.58	0.017
48 h	66.8^{A}	59.2^{B}	61.4^{B}	1.03	< 0.001
Parámetros de la cinética de producción de CH_4					
b	16.8^{A}	16.7^{A}	14.5^{B}	0.36	0.018
c	0.1	0.1	0.1	0.0011	0.458
L	2.7^{B}	3.2^{A}	2.5^{B}	0.415	0.017
Producción de CH_4 (mg/g MS incubada)					
6 h	3.3	3.1	2.9	0.03	0.323
12 h	4.3^{A}	4.7^{A}	2.6^{B}	0.05	0.002
24 h	8.3^{A}	8.6^{A}	6.4^{B}	0.16	0.017
48 h	14.0^{A}	14.5^{A}	11.8^{B}	0.31	< 0.001
Rendimiento de CH_4 (mg/g MS desaparecida)					
6 h	17.6^{A}	14.6^{B}	12.9^{C}	0.45	0.021
12h	29.6^{A}	25.2^{B}	16.8^{C}	0.83	< 0.001
24 h	43.7^{A}	34.3^{AB}	30.0^{B}	3.14	0.016
48 h	62.3^{A}	55.6^{B}	54.5^{B}	1.41	0.001
CH_4 (% de gas)					
6 h	2.65^{A}	2.65^{A}	2.45^{B}	0.05	0.003
12 h	5.1	5.6	5.4	0.03	0.045
24 h	5.6^{A}	5.4^{A}	5.1^{B}	0.06	< 0.001
48 h	9.9^{A}	9.2^{A}	8.8^{B}	0.02	< 0.001

[A-B]Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas de las medias ($p < 0.05$)

[1]b = producción asintótica de gas o de CH_4 (mL/g DM incubada); c = tasa de producción de gas o CH_4 (/h); L = fase lag (h).

[2] Error estándar de la media

Las condiciones de secado no afectaron la desaparición *in vitro* de la FDN (p = 0.256), ni la concentración de nitrógeno amoniacal (p = 0.516) (Tabla 2.1.4). El OU liofilizado tuvo un pH más bajo que el OU secado al horno (p = 0.006), pero no se registraron diferencias entre OU_{40} y OU_{60}. El secado en horno redujo las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (p <0.001) aunque no hubo diferencias entre OU_{40} y OU_{60}.

Tabla 2.1.4. Efectos de las condiciones de secado del OU País sobre los parámetros de fermentación *in vitro* a las 48 h de incubación

Ítem[1]	**OU_C**	**OU_{40}**	**OU_{60}**	**EEM**[2]	***P-valor***
Desaparición *in vitro* FDN (g FDN/100 g FDN)	26.8	27.1	26.3	0.21	0.256
pH	6.85^B	6.89^A	6.88^A	0.013	0.006
AGCC (mmol/g MS)	1.50^A	1.37^B	1.35^B	0.021	< 0.001
$N\text{-}NH_3$ (mg/dL)	8.97	8.20	8.87	0.472	0.516

[A-B]Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas de las medias (p < 0.05)
[1]AGCC, ácidos grasos de cadena corta
[2] Error estándar de la media

Hubo una relación lineal negativa entre el rendimiento de CH_4 y los contenidos de extracto etéreo (r= -0.45, p = 0.012), cenizas (r = -0.895, p <0.001) CPT (r = -0.41, p <0.001) y PA (r = -0.11, p <0.05) (Figura 2.1.1). No se identificaron relaciones entre el rendimiento de CH_4 y los contenidos de FDN (r = 0.02, p > 0.05), FDA (r = 0.03, p > 0.05) y lignina (r = 0.02, p > 0.05).

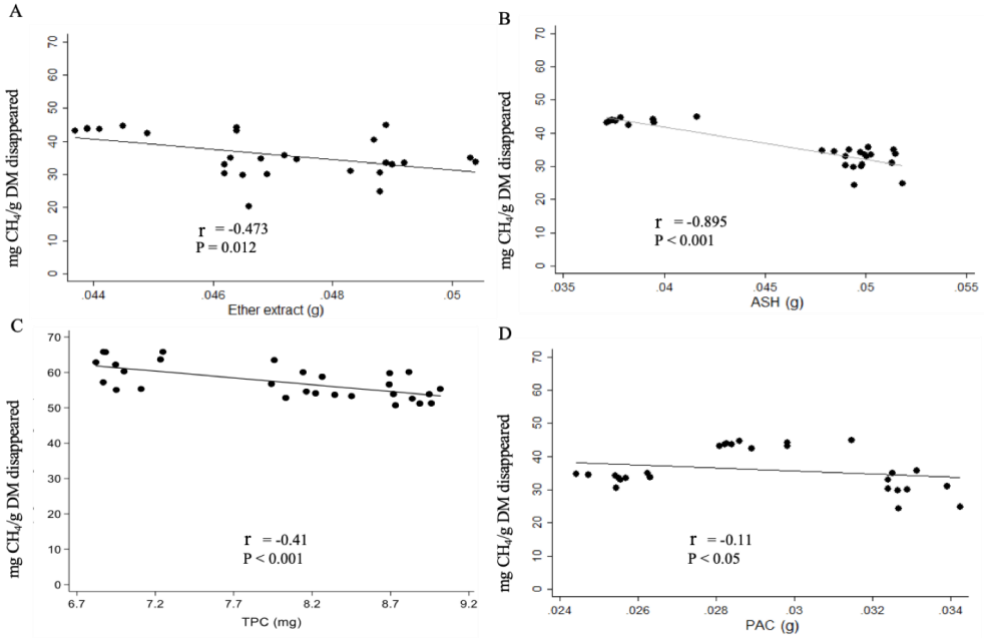


Figura 2.1.1. Relaciones entre la producción de CH_4 (mg/g MS desaparecida) a las 24 h de fermentación y los contenidos de extracto etéreo (g/kg MS) (A), cenizas (g/kg MS) (B)CPT (g/kg ms) (C) y PA (g/g MS) (D) de OU País. CH_4 (•), respuesta predicha (—).

2.1.5 Discusión

Efectos de las condiciones de secado sobre los contenidos químicos y bioactivos del OU País.

Los contenidos de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del OU País analizado en este estudio coinciden con Teles *et al.* (2018), pero son superiores a los reportados por Chikwanha *et al.* (2018). El secado en horno de OU País redujo los contenidos de compuestos bioactivos comparado con OU liofilizado, resultados semejantes a los de Çoklar and Akbulut (2017). Por su parte, Teles *et al.* (2018) reportaron

mayores contenidos de polifenoles en OU secado en horno a 60ºC que en OU secado a 40ºC. Las temperaturas de secado y tiempos de exposición determinan la estabilidad de los compuestos fenólicos (Guaita *et al.* 2021), altas temperaturas degradan los polifenoles y afectan la actividad antioxidante (Vashisth *et al.* 2011), esto podría explicar las diferencias registradas entre OU_{40} and OU_{60}. Esto es resultado de la acción del polifenol oxidasa, enzima presente en el OU relacionada con la oxidación y degradación de polifenoles (O'Donnell *et al.* 2010). Tiempos de exposición superiores a 30 minutos, a temperaturas de 60-70ºC son suficientes para inactivar la enzima (Terefe *et al.* 2015); sin embargo, 40°C es una temperatura muy baja para inactivar esta enzima (Teles *et al.* 2018). Esto explica las diferencias registradas entre OU_{60} y OU_{40}.

Las altas temperaturas, así como la liofilización de OU reducen los contenidos de proantocianidinas (Pires *et al.* 2021). Los mayores contenidos de PA obtenidos en OU_{60} en comparación con las otras condiciones de secado son consistentes con los resultados de Fuleki y Ricardo-da Silva (2003), quienes reportaron la maceración a 60 ºC durante 60 minutos como el mejor método de extracción de PA de las uvas. Los PA de OU_{60} son superiores a los valores reportados para orujos de otras variedades de uva secados al horno y al sol (Chikwanha *et al.* 2018), liofilizados (de la Cerda-Carrasco *et al.* 2015), y secados en horno (Guaita y Bosso, 2019). Los contenidos de antocianos fueron más bajos en OU País secado en horno que liofilizado, reducciones más acentuadas en OU_{40}, que al igual que las reducciones de CPT pueden ser el resultado de procesos oxidativos que implican la acción de la polifenol-oxidasa (Lingua *et al.* 2016).

La capacidad antioxidante del OU País coincide con reportes previos para OU tinto seco (Ozkan *et al.* 2022). Estos autores informaron una estrecha correlación entre la capacidad antioxidante del OU y los contenidos de polifenoles totales. Como en ese estudio, la reducción de la capacidad antioxidante de OU País secado en horno podría ser el resultado de la reducción de CPT y antocianos totales.

Efectos de las condiciones de secado en la composición química del OU País

El incremento en los contenidos de MS del OU País secado en horno coinciden con los de Tseng y Zhao (2012) y con los de Chikwanha *et al.* (2018), quienes evaluaron los contenidos nutricionales de OU secado en horno, al sol y liofilizado. Una menor humedad en las muestras de OU País secadas en horno podría ser la razón de los superiores contenidos de algunos de los compuestos químicos en OU_{40} y OU_{60}. Los contenidos de cenizas del OU País fueron superiores que los contenidos reportados para OU tintos (Bender *et al.* 2020), pero coinciden con los resultados de OU tintos despalillados (Rainero *et al.* 2021) y pieles de uvas tintas (Tseng y Zhao, 2012). Elevados contenidos de cenizas indican un alto contenido de minerales y puede ser resultado de un alto contenido de palillos en el OU (Pop *et al.* 2015). Los contenidos de PC de OU País, indistintamente de las condiciones de secado, fueron inferiores a los contenidos reportados para OU tinto (12.8–14.4% MS) (Moate *et al.* 2020, Vinyard *et al.* 2021), pero coinciden con los contenidos reportados para OU blanco (9 – 9.8% MS) (Chikwanha *et al.* 2018,

Jurácek *et al.* 2021). Estos contenidos son menores a los requerimientos mínimos (120-180 g/kg MS) para el correcto funcionamiento de los microorganismos fibrolíticos del rumen (Schwab *et al.* 2005). Esto sugiere que el uso de OU País en dietas para rumiantes requiere de fuentes adicionales de nitrógeno o su combinación con ingredientes de mayor contenido proteico. Los contenidos de EE del OU País secado al horno estuvieron dentro del rango de 7-12.5% de MS reportado por diferentes investigadores (Jin *et al.* 2019, Vinyard *et al.* 2021). Contenidos de extracto etéreo superiores a 80 g/kg MS pueden reducir la fermentación ruminal por toxicidad de los microorganismos ruminales (Jenkins, 1993) o porque la grasa cubre las partículas de fibra, impidiendo que los microorganismos accedan a ellas (Hur *et al.* 2017). Al igual que con la CP, es necesario considerar los contenidos de EE y de otros componentes de las dietas a fin de evitar efectos negativos en los parámetros de fermentación.

Reportes previos presentan una amplia variabilidad en los contenidos de FDN del OU entre el 24-48.5% MS (Chikwanha *et al.* 2018, Gowman *et al.* 2018), de FDA entre 34.0-53.5% MS (Caetano *et al.* 2019, Barraso *et al.* 2021) y de lignina entre 13.7-38.2% MS (Juráček *et al.* 2021, Vinyard *et al.* 2021). Los contenidos de FDN y lignina del OU País fueron inferiores a los reportados por Moate *et al.* (2020), Vinyard *et al.* (2021) y Tayengwa *et al.* (2021) para OU usados en alimentación de rumiantes, pero coinciden con los resultados de ensayos *in vitro* (Russo *et al.* 2017, Hixson *et al.* 2016). El contenido de celulosa del OU País fue similar a los contenidos reportados por Gowman *et al.* (2018), pero inferior a los contenidos entre 20-40% de los alimentos regulares para el ganado

(Dehority, 1991). El OU tinto contiene bajas concentraciones de azúcares, porque estos se digieren durante el proceso de fermentación del vino (Gowman *et al.* 2018), por lo cual era de esperarse bajos contenidos de glucosa y sacarosa en el OU País. Similarmente, los contenidos de EM del OU País fueron bajos comparados con los contenidos reportados (7.3-13.8 MJ/kg MS) para OU por Russo *et al.* (2017), Hixson *et al.* (2018) y Moate *et al.* (2020). Estos autores concluyeron que, dado su contenido de fibra, grasa bruta y energía metabolizable, el OU puede ser un recurso útil para alimentación de rumiantes durante períodos de escasez de alimentos, con el potencial de reducir las emisiones de CH_4 entérico.

Parámetros de la fermentación ruminal *in vitro*

Se han reportado bajos valores de DIVMS para OU (25-30%), atribuidos al alto contenido de lignina (30-40% de MS) (Famuyiwa y Ough, 1990), así mismo una baja digestibilidad de nutrientes (< 30%) que ha sido explicada por el alto contenido de taninos en el OU (Baumgärtel *et al.* 2007). La DIVMD de OU País fue más baja que las reportadas previamente. Los contenidos de lignina en OU País fueron menores a los reportados previamente, entonces es posible que los contenidos de lignina no sean responsables de la baja DIVMS. La ceniza no se fermenta en el rumen y OU País contiene altos contenidos de cenizas. La grasa reduce la fermentación ruminal y los taninos condensados inhiben los microbios y las enzimas fibrolíticas, reduciendo la digestibilidad de la MS (Vasta *et*

al. 2019). Es posible que la baja DIVMD de OU País sea el resultado de los efectos combinados de los mayores contenidos de cenizas, EE y PAC.

El potencial antimetanogénico del OU se ha asociado a sus contenidos de taninos condensados (Moate *et al.* 2014; Hixson *et al.* 2016) y considerando el alto contenido de proantocianidinas en OU País, se esperaría un alto potencial antimetanogénico. Por el contrario, el porcentaje en gas y la producción de CH_4 de OU País OU son superiores a los resultados reportados previamente (Hixson *et al.* 2016; Atalay, 2020). Las diferencias en los parámetros de producción de gas y CH_4 de OU País bajo diferentes métodos de secado pueden ser el resultado de cambios en la composición química, discutidos anteriormente. Al igual que en estudios anteriores, los resultados de proantocianidinas y EE de OU País sobre la metanogénesis ruminal no son concluyentes, por lo que es necesario realizar más investigaciones en este ámbito.

La adición de taninos a la dieta da lugar a un deterioro de la fermentación, una baja producción de AGCC y una reducción de las poblaciones de metanógenos y microorganismos fibrolíticos (Díaz-Carrasco et al, 2017). En este estudio no se registraron efectos sobre la desaparición de la FDN, por lo que parece poco probable un efecto específico sobre las poblaciones fibrolíticas. La baja concentración de AGCC de OU País podría ser el resultado de los contenidos de taninos, aunque también podría ser efecto de la formación de complejos entre taninos y proteínas o carbohidratos (Makkar, 2003). Las

relaciones entre EE, proantocianidinas y CH_4 registrada en este estudio coinciden con los reportes de Atalay (2020) y Moate *et al.* (2014).

Aunque el OU País liofilizado retuvo una mayor cantidad de compuestos bioactivos, la liofilización no es un método de secado conveniente para el procesamiento competitivo de OU para la alimentación de rumiantes. El secado al horno de a 60ºC durante 48 horas mostró una retención aceptable de sustancias bioactivas y de la composición química, así como resultados positivos sobre la reducción de la metanogénesis ruminal, esto sugiere un potencial para su incorporación en las dietas de rumiantes.

2.1.6 Conclusión

El secado en horno a 60 ºC durante 48-h permitió conservar el OU País más allá de la temporada de producción por reducción del contenido de humedad, que además de mejorar su perfil químico permitió una alta retención de polifenoles y mantuvo capacidad antioxidante. Estos resultados sugieren que el OU País 60 ºC es una buena fuente de compuestos fenólicos, grasa y fibra dietética, que podría incorporarse a la alimentación de rumiantes, con potenciales efectos sobre la reducción de las emisiones de metano entérico. Sin embargo, es necesario considerar sus contenidos de proteínas y EE para su incorporación en dietas ajustadas a los requerimientos nutricionales de los animales.

2.2 EXTRACCION ASISTIDA POR MICROONDAS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORUJO DE UVA PAÍS

2.2.1 Resumen

El objetivo de este estudio fue optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos del OU País mediante la extracción asistida por microondas para generar un extracto polifenólico estandarizado con potencial como aditivo alimentario en rumiantes. Orujo seco de uva tinta de la cepa País fue procesado mediante dos métodos de extracción utilizando mezclas hidroetanólicas en diferentes proporciones como solventes. Los métodos usados fueron extracción convencional sólido-líquido en Soxhlet y extracción asistida por microondas (EAM). La eficiencia del proceso de extracción se determinó en términos de rendimiento de extracción, contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de proantocianidinas (PAC) y capacidad antioxidante. Los extractos obtenidos mediante EAM resultaron ricos en compuestos fenólicos (hasta 363.09 mg GAE/g MS y 86.24 mg CAT/g MS), igualmente presentaron una alta capacidad antioxidante (310.10 µg TEAC/g). La extracción asistida por EAM incrementó en 59% los CPT, en 60% los PA y en 182% la capacidad antioxidante de los extractos comparados con aquellos obtenidos mediante extracción convencional. Se identificaron los principales compuestos fenólicos primarios por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), encontrando ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, quercetina, naringina, kaempferol, catequina y

epicatequina en los extractos hidroetanólicos de OU País. Así mismo, se identificó el perfil lipídico encontrando que el 17.4% de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído por Soxleth corresponden a ácidos grasos saturados y el 82.3% a ácidos grasos insaturados, siendo el ácido graso linoleico el más abundante con el 60.4%. El extracto de OU País obtenido mediante EAM es una buena fuente de compuestos bioactivos, especialmente proantocianidinas o taninos condensados, con potencial de uso como aditivo alimentario en rumiantes.

Palabras clave: polifenoles, antioxidantes, extracción, aditivos

2.2.2 Introducción

La producción de vino genera grandes cantidades de residuos, entre ellos orujo de uva (OU), constituido por pieles, pulpas y semillas, que conserva grandes cantidades de compuestos fenólicos, debido a la ineficiencia en la transferencia de estos de la uva al vino (Lorrain *et al.* 2013). El OU Contiene ácidos fenólicos, flavonoides, antocianidinas y proantocianidinas (Drevelegka y Goula, 2020). Las proantocianidinas o taninos condensados (TC), son compuestos fenólicos poliméricos solubles en agua, formados por monómeros de flavan-3-ol y sus derivados, ligados por enlaces C-C o, C-O-C (Lamy *et al.* 2016). Usados comúnmente en la industria de curtiembre, como adhesivos y en la industria del vino, los TC han sido introducidos en la alimentación animal en los últimos años. Estos compuestos afectan la fisiología animal de diferentes formas, dependiendo del tipo, estructura química y peso molecular, la cantidad ingerida y la especie animal de que se trate (Ianni y Martino, 2020). Los taninos han demostrado potencial para el control de endoparásitos (Hoste *et al.* 2022), la reducción de CH_4 entérico y una mejor utilización del nitrógeno (N) en rumiantes (Vargas *et al.* 2022). Igualmente, su uso como aditivo alimentario mejora la estabilidad oxidativa y térmica, así como el perfil lipídico de carne y leche (Vastolo *et al.* 2022).

La recuperación de taninos desde residuos y subproductos agroindustriales minimiza impactos ambientales y costos de eliminación, a la vez que añade valor e incrementa el desarrollo de nuevos productos (Fraga-Corral *et al.* 2021). La composición

química y compuestos bioactivos de las uvas y del OU, están determinados por factores como la variedad de uva, el ambiente, prácticas de manejo y de procesamiento, por lo cual las técnicas de extracción de bioactivos deben ser aplicadas en función de la composición y del propósito de uso de sus extractos (Ghendov-Mosanu *et al.* 2022). Diversas técnicas han sido utilizadas para la recuperación de compuestos bioactivos incluyendo la extracción convencional sólido-líquido, ampliamente utilizada a escala industrial (Tapia-Quirós *et al.* 2022), que se caracteriza por largos tiempos de proceso, el uso de uso de altas temperaturas y solventes orgánicos que pueden degradar los compuestos bioactivos, y generar serios impactos ambientales (Lončarić *et al.* 2018). Nuevas técnicas de extracción, como la extracción asistida por microondas (Garrido *et al.* 2019) han sido exploradas, esta reduce el tiempo de extracción (Esquivel-Hernández *et al.* 2017), demanda menor cantidad de solventes y genera mayores rendimientos (Moreira *et al.* 2018). Su eficacia depende de parámetros como la temperatura, el tiempo de irradiación y la potencia de las microondas, así como el solvente de extracción y las características propias del material vegetal. La falta de uniformidad en la composición del OU dificulta la optimización de los parámetros de extracción de sus compuestos bioactivos (Ghendov-Mosanu *et al.* 2022), por lo cual las condiciones de extracción varían entre distintas variedades de OU.

Respecto a la uva País, se ha establecido que uvas y zumos presentan contenidos de polifenoles totales entre 10-50 mg GAE/g, y una capacidad antioxidante entre 5.5-55 mmol Trolox equivalente /L (Lutz *et al.* 2012, Aguilar *et al.* 2018, Ide *et al.* 2021). Las

semillas de uva País presentan altos contenidos de proantocianidinas, caracterizadas por un bajo peso molecular, con epicatequina y epicatequina gallato como unidades monoméricas más abundantes (Figueroa *et al.* 2020). La información sobre el OU País o sus extractos es escasa; sin embargo, considerando los reportes de sus altos contenidos de proantocianidinas, la alta disponibilidad de OU en las zonas vitivinícolas y los potenciales impactos de los TC sobre las emisiones de CH_4 entérico y de nitrógeno derivadas de la producción de rumiantes, el objetivo de este estudio fue optimizar el proceso de extracción asistida por microondas de compuestos bioactivos del OU País para generar un extracto polifenólico con potencial como aditivo alimentario en rumiantes.

2.2.3 Materiales y métodos

Reactivos

Se utilizó el reactivo de Folin Ciocalteu (2 N), etanol, metanol gradiente para HPLC, ≥99.9%, n-hexano, ácido clorhídrico, ácido gálico (97-102,5% de pureza), catequina hidrato (+) y ácido 6-hydroxy-2,- 5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylico (Trolox) (Merck, Darmstadt, Germany). El reactivo de DPPH- (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo, carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 4-(Dimethylamino) cinnamaldehydo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Preparación de la muestra de OU país

Se recolectó OU de la cepa País (*Vitis vinífera* L.) proveniente del valle del Itata (Ñuble-Chile), de la vendimia de 2019, del laboratorio de microvinificación de la Universidad de Concepción (Chillán-Chile). Inmediatamente después del descube las muestras fueron secadas en horno de aire forzado a 60ºC durante 48 horas hasta alcanzar una humedad residual de 5.6%. Posteriormente, las muestras fueron molidas a 2 mm, empacadas en bolsas herméticas y mantenidas a -80ºC hasta su procesamiento, los extractos fueron preparados en los tres días posteriores a la molienda. Inmediatamente antes de la extracción el OU fue descongelado a temperatura ambiente y molido en un molino de café, de acero, durante 20 segundos hasta llegar a un tamaño de partícula aproximado de 0.5 mm.

Extracción de compuestos bioactivos del OU País

Previo a la extracción, submuestras de cinco gramos de OU País de cada método de desecación fueron desengrasados usando un aparato Soxhlet usando éter de petróleo (100 mL) como solvente, hasta agotamiento. El solvente fue removido por evaporación en rotovapor (Laborota 4000, Heidolph®, Alemania) a 40ºC según Da Porto *et al.* (2013). El residuo fue mantenido en estufa a 40ºC por dos horas para eliminar cualquier resto de humedad. El orujo desengrasado obtenido fue colectado y almacenado a -80ºC hasta el

proceso de extracción. La fracción polar obtenida fue colectada y almacenada para posterior análisis de ácidos grasos.

Extracción convencional

Se realizó una maceración convencional para obtener extractos que sirvieran de control. Una mezcla de 500 mg de OU y 20 mL solvente (etanol-agua destilada, 80:20 v/v) fue incubada en un agitador orbital (100 rpm; Unimax 1010 Heidolph, Alemania) durante 1 h a temperatura ambiente de acuerdo con Milinčić *et al.* (2021). Una vez terminada la incubación, el líquido se filtró a través de papel de filtro Whatmann Nº 1 y el solvente fue removido por evaporación en rotavapor (Laborota 4000, Heidolph®, Alemania), a temperatura máxima de 40ºC. El extracto obtenido fue recuperado, pesado y el rendimiento de extracción calculado como un porcentaje del peso del extracto obtenido, en relación con la materia seca de la muestra utilizada para la extracción, como se describe en la ecuación:

$$Rendimiento\ de\ extracción(\%) = \left(\frac{Masa\ del\ extracto}{Masa\ de\ la\ muestra}\right) * 100$$

El extracto obtenido fue conservado en oscuridad a -80ºC hasta su evaluación. La extracción fue realizada por triplicado.

Extracción asistida por microondas

Los compuestos fenólicos fueron extraídos usando un equipo de microondas CW-2000 (Shangai Xtrust Analytical Instrument, China), equipado con un condensador de reflujo de aire y agua y un agitador magnético. Se depositaron muestras de OU desengrasado junto al solvente en un matraz de extracción. Una vez se completó la extracción, los extractos fueron filtrados al vacío (papel 1.90 mm$^{\phi}$) y el solvente recuperado por evaporación en rotavapor (Laborota 4000, Heidolph®, Alemania) a temperatura máxima de 40ºC. El rendimiento de extracción fue determinado como un porcentaje del peso del extracto obtenido en relación con la materia seca de la muestra utilizada para la extracción, como se describió previamente. A cada matraz con extracto se adicionó 5 mL de solvente, se centrifugó (4900 rpm, 4ºC por 15 minutos) y se tomó alícuotas de cada uno en una dilución en agua destilada (1:100 v/v), las cuales se mantuvieron en oscuridad a -80ºC hasta su análisis. Todas las extracciones se realizaron en duplicado.

Diseño experimental para la modelización y optimización de extracción asistida por microondas

Se utilizó un diseño factorial de cuatro factores con tres niveles cada uno (4^3), para establecer las condiciones óptimas para maximizar la extracción asistida por microondas, de compuestos fenólicos del OU País. La variables evaluadas fueron: la

concentración de etanol en la mezcla de etanol y agua (%, v/v), la relación soluto-solvente (g/mL), el tiempo de extracción en segundos (s) y la potencia de extracción del microondas (W), las variables y sus niveles son descritas y codificadas en la Tabla 2.2.1., cada extracción se realizó en duplicado. Las respuestas evaluadas fueron rendimiento de extracción (%), contenido de polifenoles totales (mg GAE/g OU), contenido de proantocianidinas (mg CAT/g OU) y capacidad antioxidante (eq-mg Trolox /g OU).

Tabla 2.2.1. Factores y niveles evaluados en la extracción asistida por microondas

FACTOR	NIVEL		
	-1	**0**	**1**
Concentración solución etanólica (%, v/v)	40	80	100
Relación soluto-solvente(g/mL)	1:40	1:20	1:10
Tiempo (s)	60	100	120
Potencia (W)	200	400	800

Análisis de los extractos

Determinación del contenido de polifenoles (CPT). El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Se mezclaron 30 µL del extracto diluido en agua destilada (1:100 v/v), con 150 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:10 v/v) en una microplaca de 96 pocillos, se adicionaron 120 µL de una solución acuosa de carbonato de sodio (7.5%, p/v), y la mezcla se dejó incubar por 45 minutos en la oscuridad. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA) a 765 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos son expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de materia seca (mg GAE/g MS). Previo a las

mediciones se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de acido gálico en el rango de concentraciones entre 0.2 a 1.6 mg/mL.

Cuantificación de proantocianidinas (PAC). Se realizó por el método de DMAC ajustado (Payne *et al.* 2010), se realizó una segunda dilución (1:100 v/v) de cada alícuota de los extractos. En una placa de 96 pocillos, se mezcló 70 µL de muestra con 230 µL del reactivo DMAC (0.1 mg/mL), se incubó en la oscuridad durante 20 minutos y la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA) a 640 nm. Se uso etanol como blanco y todas las mediciones se realizaron por triplicado. Las concentraciones se determinaron por comparación con una curva de calibración de catequina entre 50 y 500 µg/mL. Los resultados fueron expresados en mg de catequina equivalente por g de materia seca (mg CAT/g OU).

Determinación de actividad antioxidante. La capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo de barrido de radicales de DPPH según Brand-Williams *et al.* (1995). Una submuestra (20 µL) de una segunda dilución del extracto de OU fue mezclada en una microplaca de 96 pocillos, con 280 µL de DPPH metanólico (absorbancia 1.1), se incubó en oscuridad por 20 minutos. La absorbancia se midió a 517 nm utilizando un espectrofotómetro (Epoch 256695, BioTek, Vermont, USA). Los resultados se expresaron como µg de Trolox equivalente por g de materia seca (µg TEAC/g MS), usando metanol como blanco y reactivo de DPPH como control.

Identificación de principales compuestos fenólicos primarios por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los compuestos fenólicos primarios del extracto se identificaron mediante HPLC. Las muestras se analizaron simultáneamente a 220 y 400 nm utilizando una bomba binaria (modelo L-7100, Merck-Hitachi LaCh-rom) y un detector de matriz de diodos (modelo L-7455, Merck-Hitachi LaChrom), acoplados a una columna Kromasil KR100-5C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm) operada con un software Clarity. El programa de gradiente de elución consistió en dos disolventes de fase móvil, el solvente A (agua para HPLC con 0.1% de TFA, v/v) y el solvente B (acetonitrilo con 0.1% de TFA) con un caudal de 0.3 mL/min se detalló como se detalla a continuación; proporción 90% A y 10% B durante el tiempo cero. Después de 25min la proporción se ajustó a 70% A y 30% B; a 25% A y 75% B a 30 min, a 90% A y 10% B a 35 min; finalmente, 90% A y 10% B a 40 min. La columna se equilibró entre inyecciones durante 30 min en las condiciones iniciales.

Identificación del perfil de ácidos grasos de la fracción polar obtenida por Soxleth

La fracción polar obtenida durante el desengrasado del OU fue analizada para establecer el perfil lipídico del OU País. Los lípidos se extrajeron siguiendo los métodos de Bligh y Dyer (1959) y el perfil relativo de ácidos grasos se determinó mediante el método oficial ISO 12966:2011 para ácidos grasos en aceites, grasas animales y vegetales

(Organización Internacional de Normalización [ISO], 2000). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases (HP 5890, Hewlett Packard HP serie II 5890, Palo Alto, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID), un software integrado (Young Lin Autochro-3000® software, 2.0; YL Instruments, Corea) y una columna HP-FFAP (25 m × 0,2 μm de diámetro). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 210°C y 240°C, respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 150°C mantenida durante 2 minutos, y luego se incrementó 10°C/min a 230°C, 6°C/min a 215°C, y 30°C/min. El gas portador fue Helio (flujo de 28.5 cm/s). La composición relativa de ácidos grasos se expresó como el porcentaje de cada ácido graso identificado en el total de ácidos grasos medidos en el extracto obtenido.

Análisis estadístico

El proceso de extracción fue realizado duplicado, los análisis de CPT, PA y capacidad antioxidante por triplicado y los resultados son expresados como la media ± desviación estándar (DE). Se analizó los efectos de las condiciones individuales y sus interacciones mediante un análisis de varianza mediante el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\delta)_{il} + (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde Y_{ikj}= contenido de polifenoles totales, contenido de proantocianidinas, rendimiento de extracción o capacidad antioxidante; μ= media global, α_i= efecto de la i-

ésima concentración etanólica, $ß_j$ = efecto de la j-ésima relación soluto-solvente, γ_k= efecto del k-ésimo tiempo, δ_l= efecto de la l-ésima potencia, $(\alpha ß)_{ii}$= interacción de la i-ésima concentración etanólica y la i-ésima relación soluto-solvente, $(\alpha\gamma)_{ik}$= interacción de la i-ésima concentración etanólica y k-ésimo tiempo, $(\alpha\delta)_{il}$= interacción de la i-ésima concentración etanólica y la l-ésima potencia, $\alpha ß\gamma\delta_{ijkl}$= interacción de la i-ésima concentración etanólica, la j-ésima relación soluto-solvente, el k-ésimo tiempo y la l-ésima potencia; y ε_{ijkl} = error residual. Se realizó comparación de medias mediante test de Tukey.

Con base en las máximas respuestas del diseño factorial se determinó y validó las condiciones óptimas de extracción asistida por microondas para los contenidos de polifenoles totales y proantocianidinas, mediante la función de deseabilidad (Rudnykh y López-Ríos, 2018) para seleccionar las mejores condiciones a fin de maximizar la extracción de CPT y PAC. Con base en los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje de repetibilidad y el error de la medida. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) para calcular las relaciones entre la capacidad antioxidante y los CPT y PAC. Todos los análisis fueron realizados usando el software Minitab versión 19. En todos los análisis la significancia fue declarada cuando $p<0.05$.

2.2.4 Resultados y discusión

Efectos de las condiciones de extracción sobre el rendimiento de extracción y concentraciones de compuestos bioactivos del OU País

Los rendimientos de la extracción convencional de las fracciones polar y apolar de OU País, así como los CPT, PAy capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante este método son presentados en la Tabla 2.2.2. Los rendimientos de extracción de la fracción lipídica son superiores a los resultados de Barriga-Sánchez *et al.* (2022), quienes establecieron rendimientos de extracción de aceite de semillas de uva entre 10 y 13%, y con los de Göktürk-Baydar *et al.* (2007) quienes reportaron contenidos de aceite entre 12-16% para semillas de uva, y entre 5-8% para OU sin semillas. El rendimiento de extracción de polifenoles esta dentro de los rangos para OU del 5 al 10% reportados por Beres *et al.* (2017). Los CPT de los extractos obtenidos mediante extracción convencional están dentro de los rangos de reportados por Teles *et al.* (2018), pero son más altos que los contenidos reportados por Chikwanha *et al.* (2018) y Ozkan *et al.* (2022). Los contenidos de proantocianidinas obtenidos mediante este método son superiores a los contenidos reportados previamente para extractos de OU (Aboagye *et al.* 2019), pero coinciden con los reportados por Martínez-Meza *et al.* (2021) para OU Malbec extraídos mediante la metodología de caída de presión instantánea y controlada.

Tabla 2.2.2. Rendimientos, contenidos de polifenoles, proantocianidinas y capacidad antioxidante de extractos de OU País obtenidos por extracción sólido-líquido convencional.

Parámetro	Media	Desviación Estándar
Rendimiento fracción lipídica (%)	16.16	3.9
Rendimiento fracción polifenólica (%)	9.6	2.1
[1]CPT (mg GAE/g)	182.45	1.7
[2]PA (mg CE/g)	56.98	2.7
Capacidad antioxidante (μg TEAC/g)	109.89	43.2

[1] CPT: contenido de polifenoles totales (eq-mg AG por gramo de OU)
[2] PA: contenido de proantocianidinas totales (eq-mg CAT por gramo de OU)

La Tabla 2.2.3 presenta los efectos de los factores individuales del proceso de extracción asistida por microondas sobre el rendimiento de extracción, CPT, PA y capacidad antioxidante. Un incremento de CPT y PA se registró en función del incremento del volumen de solvente en relación con la masa de OU, alcanzando valores máximos para la relación 1:40. Una marcada reducción de CPT, PA y de la capacidad antioxidante se registró para la relación soluto-solvente de 1:10. Jovanović *et al.* (2021) establecieron que el incremento de la relación soluto-solvente induce un mayor gradiente de concentración, incrementando el rendimiento de extracción. La presencia de una mayor cantidad de solvente (relación 1:40) reduce la saturación del medio, incrementando la concentración de polifenoles extraídos. Los resultados de este estudio coinciden con los hallazgos de Hammi *et al.* (2015), quienes reportaron un incremento lineal de la concentración de polifenoles extraídos por ultrasonido con el incremento de la relación soluto: solvente.

Tabla 2.2.3. Efectos de las condiciones de extracción sobre rendimiento, contenido de polifenoles, proantocianidinas y capacidad antioxidante de extracto de OU País obtenido por extracción asistida por microondas

Parámetro	Nivel	Rendimiento (%)	DE[1]	Polifenoles totales (mg GAE/g OU)	DE	Proantocianidinas (mg CATE/g)	DE	Capacidad antioxidante (µg Teac/g)	DE
Solvente (etanol-agua, % v/v)	100	10.55	1.8	13.92	2.1	46.75	7.7	160.561	28.9
	80	11.69	1.3	15.68	2.3	55.05	6.8	198.869	34.2
	40	10.98	2.8	12.88	1.9	33.88	3.8	161.947	29.1
p-valor		ns		Ns		ns		ns	
Relación soluto: solvente g/mL)	0.025	12.46[a]	1.6	21.56[a]	2.4	98.17[a]	20.1	256.14[a]	35.1
	0.05	11.30[b]	1.9	13.97[b]	2.2	49.59[b]	16.3	162.57[b]	21.3
	0.1	9.45[c]	1.7	6.96[c]	2.6	15.97[c]	5.2	102.66[c]	18.9
p-valor		0.045		0.023		0.009		0.004	
Tiempo (s)	120	12.18[a]	1.7	12.70[c]	1.9	35.80[c]	9.8	177.75[a]	17
	100	11.90[a]	2.7	13.79[b]	1.4	89.79[a]	25.6	176.08[a]	24.1
	60	9.14[b]	1.8	15.99[a]	1.6	49.09[b]	14.2	167.55[b]	35.1
p-valor		0.010		0.003		0.025		0.009	
Potencia (W)	800	10.54	2.0	16.89[a]	2.1	86.97[a]	18.5	207.71[a]	38.6
	400	11.98	1.8	14.78[b]	2.0	42.57[ab]	13.2	175.76[ab]	21.6
	200	10.70	1.6	10.82[c]	1.7	26.13[b]	9.8	137.90[b]	19.6
***p*-valor**		ns		0.001		0.001		0.003	

[1] DE= desviación estándar, ns= $p<0.05$

[a-c]Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas de las medias ($p < 0.05$)

El rendimiento de extracción se incrementó con el tiempo de aplicación de las microondas (p=0.010), así mismo el tiempo afectó los valores de CPT (p=0.003), PA (p=0.025) y la capacidad antioxidante, aunque estos valores variaron de manera irregular en función del tiempo. Un incremento en los valores de CPT a menor tiempo fue registrado, obteniendo mayores extracciones a 60 S y resultados más bajos a 120 s. Entre tanto, los máximos valores de PA fueron registrados a 100 s, alcanzando 89.79 mg CAT equ/g MS, y los valores más bajos (35.80 mg CAT equ/g MS) para extractos obtenidos con 120 s de exposición. Las microondas destruyen las células vegetales, facilitando la penetración del solvente y la liberación del contenido celular, por consiguiente, incrementa la transferencia de masa (Drevelegka y Goula, 2020). Una razón de los bajos

valores de CPT con el incremento del tiempo de microondas, es que la absorción de la energía de microondas promueve la acumulación de calor, acelerando la disolución de los polifenoles (Jia *et al.* 2021), altas temperaturas, así como tiempos prolongados de exposición destruyen los polifenoles y otros ingredientes activos (Papoutsis *et al.* 2017).

Una mayor potencia no incrementó el rendimiento de extracción, pero si las concentraciones de CPT (p=0.001), PA (p=0.001) y la capacidad antioxidante (p=0.003), proporcionalmente al incremento de la potencia. Resultados que coinciden con los de Drevelegka y Goula, (2020) para extracción asistida por microondas, de extractos hidroalcohólicos de OU. Los CPT y PA alcanzaron valores máximos de 16.89 mg GAE/g MS y de 86.97 mg CAT equ/g MS, respectivamente cuando se aplicó la máxima potencia (800 W). Una alta potencia de microondas desencadena una ruptura acelerada de la pared celular de las semillas de uva y con ello, la liberación de los ingredientes activos (Chew *et al.* 2019). Por otra parte, Zhang *et al.* (2016) reportaron que potencias superiores a 180 W reducen el rendimiento de extracción de los polifenoles totales, posiblemente por incremento excesivo de la temperatura y ebullición del alcohol, causando destrucción de los compuestos bioactivos.

Las diferentes combinaciones de las condiciones generaron rendimientos de extracción entre 4.01 y 25.5% MS, que coinciden con los resultados de entre 9.92%-24.35% MS, reportados por Drosou *et al.* (2015) para extracciones asistidas por microondas de OU. La concentración de polifenoles totales varió entre 28.3 y 394.2mg GAE/g MS, con mayores contenidos de polifenoles obtenidos con la combinación de factores: soluto-solvente 1:40, tiempo de 60 s, la potencia de 800 W y solvente ETOH

80%. Los contenidos de proantocianidinas variaron entre 7.7-99.6 mg CAT/g MS, con mayores contenidos para la combinación de factores: solvente ETOH 80%, relación soluto-solvente 1:40 y potencia 800 W. Para esta variable no se registraron efectos del tiempo de extracción, resultados que coinciden con los de Natolino y Da Porto (2020). La capacidad antioxidante de los extractos varió entre 25.2 y 310.10 μg TEAC/g MS; la combinación de condiciones para maximizar la capacidad antioxidante (310.10 μg TEAC/g MS) de los extractos fue: ETOH 80%, relación soluto solvente 1:40, tiempo 100 s y potencia 800 W. Los resultados de la correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y CPT, (r= 0.98, p<0.001) y entre la capacidad antioxidante y PA (r = 0.94, p<0.001), corroboran la directa relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles y de proantocianidinas de los extractos (Guendez *et al.* 2005), resultados que coinciden con los de Milinčić *et al.* (2021).

Optimización de las condiciones de extracción asistida por microondas de OU País

La función de deseabilidad del Minitab v.19 indicó que para alcanzar la extracción máxima de CPT, con un valor predicho de 366.17 mg GAE/g MS, las condiciones optimas son ETOH 40%, relación soluto-solvente 1:40, tiempo 60 s y potencia 800 W. Sin embargo, para alcanzar la extracción máxima de proantocianidinas, con un valor predicho de 98.65 mg CAT/g MS la combinación optima de condiciones es: ETOH 80%, relación soluto-solvente 1:40, tiempo 100 s y potencia 800 W. Los valores experimentales

observados para estos conjuntos de condiciones fueron: 363.09 mg GAE/g MS y 86.24 mg CAT/g MS.

Considerando que el objetivo final del extracto es su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes, como estrategia para reducir emisiones de CH_4 entérico y modular la fermentación ruminal de la proteína, se privilegió la maximización de la extracción de proantocianidinas para optimizar la respuesta, a la vez que se consideró maximizar el rendimiento de extracción, una alta extracción de CPT, un menor consumo de solvente y menor tiempo de extracción. Las condiciones óptimas para una respuesta predicha de CPT de 278.9 mg GAE/g MS, de proantocianidinas de 99.84 mg CAT/g MS, de rendimiento de extracción de 12.6%, con una deseabilidad compuesta de 0.95, fueron: ETOH 80%, relación soluto-solvente 1:40, tiempo 100 s potencia 800 W. Para validar la respuesta se determinó la repetibilidad (Tabla 2.2.4) de acuerdo con Portuondo y Portuondo (2010). Se considera una repetibilidad alta la mayor a 0,90, lo que indica que el procedimiento es repetible para los tres parámetros evaluados. El porcentaje de error absoluto de los resultados predichos por el modelo frente a los resultados experimentales aplicando las condiciones optimizadas fue calculado de acuerdo a Trujillo-Mayol *et al.* (2019) con la ecuación:

$$E = \frac{(Va - Vt)}{Vt} * 100$$

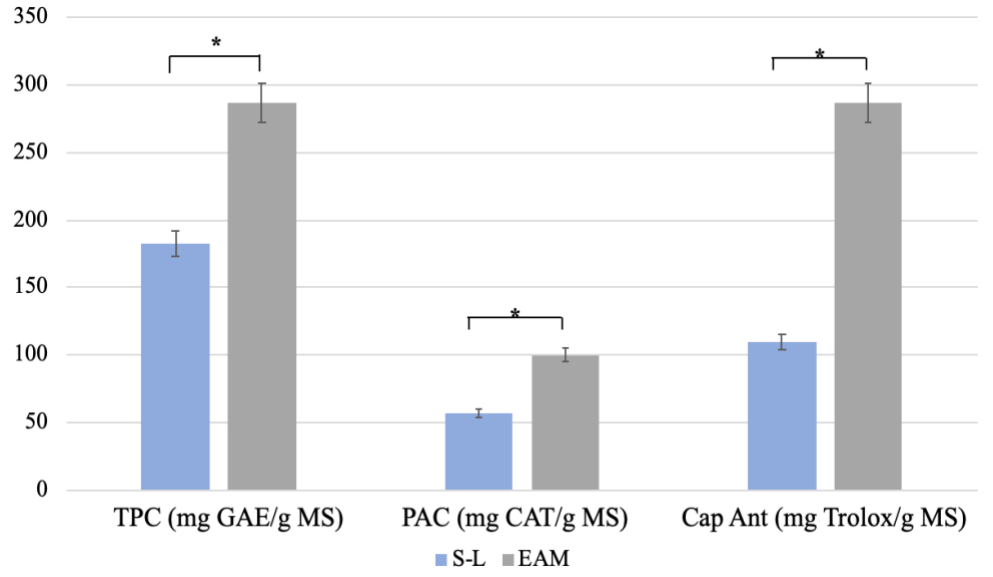
Donde Va es el valor calculado experimentalmente y Vt es el valor predicho.

Tabla 2.2.4. Repetibilidad y error de medida de las condiciones óptimas de extracción asistida por microondas.

Repetición	**Rendimiento (%)**		**PPT (mg GAE/g)**		**PA (mg CAT/g Ex)**	
	Obtenido	Predicho[1]	Obtenido	Predicho	Obtenido	Predicho
1	12.06	12.19	286.71	287.24	98.69	99.78
2	11.93		263.47		97.85	
3	11.44		317.67		99.04	
Repetibilidad (%)	95.01		91.82		95.47	
Error de medida	0.031		0.071		0.092	

[1]Valor predicho obtenido mediante la función de deseabilidad.

La metodología asistida con microondas incrementó sustancialmente la extracción de compuestos bioactivos del OU País (Gráfica 2.2.1) comparado con la extracción sólido-líquido convencional utilizada en este estudio. Un incrementó del 59% fue registrado para CPT (p=0.031) y del 73% para PA (p=0.005). La capacidad antioxidante difirió sustancialmente entre la extracción convencional y la extracción asistida por microondas (p=0.022), con un incremento del 182% para esta última. El rendimiento de extracción también fue incrementado en 23%, por la extracción asistida con microondas (p=0.047), resultados que coinciden con los de Brahim *et al.* (2014) quienes compararon extracción convencional con asistida por microondas.



Gráfica 2.2.1. Rendimientos de extracción de polifenoles totales (CPT), proantocianidinas (PA) y capacidad antioxidante de extractos de OU País obtenidos mediante extracción sólido-líquido (S-L) convencional y asistida por microondas (EAM). (*) $p<0.05$

Identificación de principales compuestos fenólicos primarios por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se identificaron nueve compuestos fenólicos primarios en el extracto de OU País, un ácido hidroxibenzoico (ácido gálico), dos ácidos hidroxicinámicos (cafeico y cumárico), flavonoles (quercetina, naringina y kaempferol), y flavanoles (catequina y epicatequina), a través de HPLC (Figura 2.2.1). Resultados que coinciden con Lutz *et al.* (2012), quienes reportaron que los compuestos fenólicos más abundantes en la piel de uva País son, ácido cafeico, ácido gálico, catequina y resveratrol; y con Figueroa *et al.* (2020), quienes caracterizaron los compuestos fenólicos de extractos de semilla de uva País,

encontrando que los compuestos más abundantes son epicatequina y epicatequina galato, que el grado de polimerización media de los compuestos fenólicos del extracto fue 9.2 y que el 58.9% de las moléculas identificadas tenían un bajo peso molecular (<9263 g/mol).

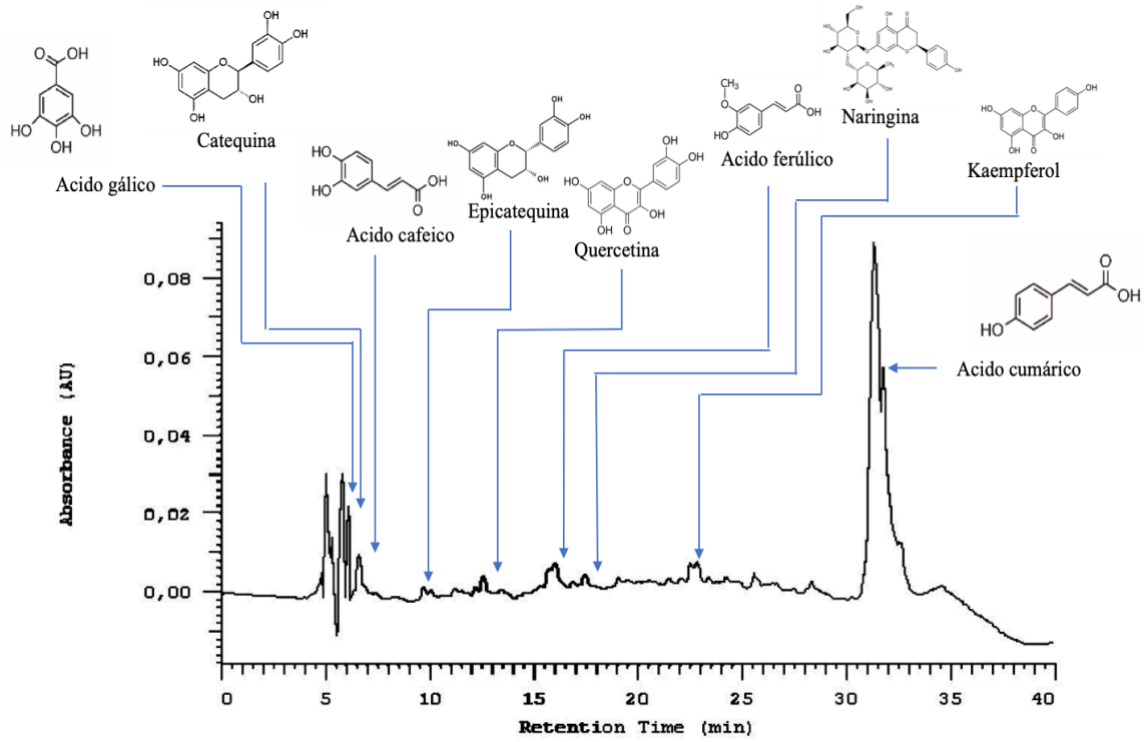


Figura 2.2.1. Cromatograma de HPLC de los principales compuestos fenólicos primarios de un extracto de OU País

Identificación del perfil de ácidos grasos de la fracción polar del OU País

La composición de ácidos grasos de las muestras de aceite extraídas del OU País por el sistema Soxhlet se presentan en la Tabla 2.2.5. Los ácidos linoleico, oleico y palmítico fueron los ácidos grasos más abundantes en las muestras evaluadas. El ácido

palmítico representó el 8.8%, el acido esteárico representó el 6.6% y el araquídico el 2.2% del total de ácidos grasos. El contenido de ácido oleico fue 21.9%, mientras que el ácido linoleico representó el 60.4% del total de ácidos grasos. Los contenidos de ácidos grasos individuales obtenidos en este ensayo son superiores a los reportados previamente por Mohamed Amed *et al.* (2019) para polvo de OU de distintas variedades, pero coinciden con los reportes de Iora *et al.* (2015) para OU tinto.

Tabla 2.2.5. Perfil de ácidos grasos del aceite de OU País obtenido por el sistema Soxleth.

Acido graso	% del total de ácidos grasos
C 16:0 Acido palmítico	8.8
C 18:0 Acido esteárico	6.6
C 20:0 Acido araquídico	2.2
Total ácidos grasos saturados	**17.6**
C 18:1 Acido oleico	21.9
C 18:2 Linoleico	60.4
Total ácidos grasos insaturados	**82.3**

2.2.5 Conclusión

La metodología de EAM incrementó la recuperación de compuestos fenólicos del OU País comparado con la extracción convencional sólido-líquido, incrementando la capacidad antioxidante de los extractos en 180. El rendimiento de extracción, los CPT, y la capacidad antioxidante del extracto de OU País mostraron una relación directamente proporcional al incremento del tiempo de exposición; sin embargo, esto no fue así para las PA que fueron mayores aplicando el tiempo medio de exposición (100 s). El extracto

de OU País obtenido en este ensayo presenta altos contenidos de TC, polifenoles y una alta capacidad antioxidante, por lo cual es necesario evaluar sus efectos sobre la producción de CH_4 entérico y sobre la digestión de la proteína.

CAPITULO 3

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO DE OU PAÍS COMO INGREDIENTE DE DIETAS PARA RUMIANTES SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACION RUMINAL, PRODUCCIÓN DE CH4, Y POBLACIONES MICROBIANAS *IN VITRO*

3.1 EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA PAÍS EN DIETAS CON ALTO Y BAJO CONTENIDO DE FORRAJE: FERMENTACIÓN RUMINAL, PRODUCCIÓN DE METANO Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

3.1.1 Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la inclusión de orujo de uva (OU) País en dietas para rumiantes altas (AF) y bajas en forraje (BF) sobre la producción de metano (CH_4) y los parámetros de fermentación ruminal en un cultivo *in vitro* tipo *batch.* En los tratamientos experimentales se sustituyó el forraje por OU en concentraciones crecientes (0, 10%, 20% de materia seca [MS]) en los sustratos de incubación. Se midió la producción de gas (PG), la producción de CH_4 a las 6, 12 y 24 h de incubación y se determinó la desaparición *in vitro* de la materia seca, los ácidos grasos volátiles (AGV) y el nitrógeno amoniacal ($N\text{-}NH_3$) a las 24 h. La inclusión de OU al 10% y 20% MS redujo las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ ($p<0.001$) en 48% y 58% respectivamente. La inclusión de OU al 20% MS redujo las concentraciones de AGV ($p = 0.049$) en 21% para la dieta AF y 11% para la dieta BF. La inclusión de OU al 20% MS redujo el porcentaje de CH_4 en gas ($p = 0.038$), la producción ($p= 0.004$) y el rendimiento de CH_4 ($p= 0.027$), pero generó una reducción de la DIVMS ($p<0.001$), la producción de gas ($p<0.001$) y los AGV totales ($p= 0.001$). En conclusión, en condiciones de cultivo en *batch*, la sustitución parcial del

forraje por OU País en dietas altas y bajas en forraje tiene el potencial de reducir las concentraciones de N-NH_3 y la producción y el rendimiento de CH_4 con una reducción de la DIVMS.

Palabras clave: Rumiantes, polifenoles, subproductos, amoníaco, gases de efecto invernadero.

3.1.2 Introducción

La agricultura proporciona alimentos de alta calidad a la humanidad, pero se enfrenta al reto de alimentar a una población creciente al tiempo que reduce su impacto ambiental (Rojas-Downing *et al.* 2017). La producción de ganado rumiante contribuye a la huella ambiental de la agricultura mediante la generación del 18% del CH_4 (Xu *et al.* 2021) y el 32% de las emisiones de óxido nitroso (N_2O) (Uwizeye *et al.* 2020). El uso de subproductos agrícolas como componentes de la dieta de los rumiantes ha generado un creciente interés dada su contribución al incremento de la sostenibilidad y el estímulo de las economías circulares (García-Rodríguez *et al.* 2019). Los subproductos agroindustriales también pueden contener altas concentraciones de nutrientes funcionales, como ácidos grasos insaturados que podrían mejorar la calidad del producto y la salud humana, o metabolitos secundarios como los taninos condensados que tienen el potencial de reducir las emisiones entéricas de CH_4 y mejoran el uso del nitrógeno (Aboagye y Beauchemin 2019). Los subproductos agroindustriales son de bajo costo y, desde la perspectiva de la evaluación del ciclo de vida, están libres de emisiones de GEI, ya que estos se atribuyen al producto primario (Williams *et al.* 2014). Como tal, la inclusión de residuos agroindustriales en las dietas animales es una alternativa rentable y efectiva para la sustitución parcial de las fuentes forrajeras (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.* 2018). Los recursos alimentarios no convencionales, como los subproductos de la fruta, pueden suplir parcialmente la escasez de alimentos balanceados, reducir la competencia entre humanos y animales por la alimentación, reducir los costos de alimentación y contribuir a

la seguridad alimentaria a partir de recursos disponibles localmente. La industria vitivinícola produce grandes cantidades de residuos orgánicos, de los cuales el 25% corresponde a orujo de uva (OU), cuya gestión presenta serios desafíos ambientales y económicos (Spigno *et al.* 2017). Debido a su bajo costo y sus contenidos de fibra y energía, el OU se ha utilizado como sustituto de las fuentes fibrosas en la alimentación de rumiantes (Manso *et al.* 2016). El OU contiene también concentraciones variables de lípidos (5.2-185 g/kg MS, de los cuales el 70% son ácidos grasos poliinsaturados) y taninos condensados (TC; 6.9-139 g/kg MS), que se consideran compuestos prometedores como moduladores de la fermentación ruminal, para reducir la producción de CH_4 y la excreción de nitrógeno de los sistemas de producción ganadera (Hixson *et al.* 2016). Las semillas de uva son una buena fuente de taninos condensados galloilados y de galato de epigalocatequina (un monómero de flavan-3-ol galloilado) que son inhibidores de la ureasa (Takeuchi *et al.* 2014), que a su vez reduce las emisiones de amoníaco en la orina y la consiguiente formación de N_2O (Kingston-Smith *et al.* 2010), lo que representa una oportunidad para reducir el impacto ambiental de las emisiones de nitrógeno de los rumiantes.

Las variaciones en las concentraciones de lípidos y TC en el OU pueden ser el resultado de la variedad de uva, las prácticas culturales y los procesos de elaboración del vino (Sphangero *et al.* 2009), por lo cual se requiere una evaluación de los recursos disponibles a escala local. Existe información sobre el uso de OU en rumiantes lecheros en condiciones *in vivo*, aunque la investigación sobre este recurso en condiciones *in vitro* para evaluar sus efectos sobre la fermentación ruminal es escasa (Hixson *et al.* 2016;

Russo *et al.* 2017). En la actualidad existen pocos informes sobre OU de variedades locales (Lopes *et al.* 2014), pero ninguno evaluó la uva País (*Vitis vinifera* L.), una variedad ancestral de uva cultivada en las regiones de Bio Bio y Ñuble, en la zona central de Chile, que posee mayores cantidades de taninos condensados que las variedades de uva comerciales como Carmenère o Pinot Noir (Villarroel 2009).

La producción de vino en Chile superó los mil millones de litros en el año 2020, generando más de 200 mil toneladas de OU que se depositan de forma directa en vertederos, provocando graves impactos ambientales como la contaminación de las aguas, la generación de olores y la fitotoxicidad (Beres *et al.* 2017), impactos que podrían reducirse si el OU es utilizado como alimento para animales. Dado que los efectos de los taninos en la dieta varían según el contenido de forraje y concentrado de la misma (Vasta *et al.* 2009; Yogianto *et al.* 2014), el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la inclusión de concentraciones crecientes de OU País en la cinética de fermentación ruminal, la producción de CH_4, $N\text{-}NH_3$ y AGV en dietas para rumiantes con diferentes proporciones de forraje-concentrado, utilizando una técnica de producción de gas *in vitro* tipo *batch*.

3.1.3 Materiales y métodos

Orujo de uva País

El origen, procedimientos de secado y conservación del OU País es descrita a detalle en el estudio 2.2 de esta tesis.

Diseño experimental y tratamientos

Se realizó un cultivo tipo *batch* en un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de 2 × 3. Los 6 tratamientos fueron una combinación de dos relaciones forraje-concentrado, alto en forraje (AF, relación forraje-concentrado 60:40) y bajo en forraje (BF, relación forraje-concentrado 35:65) y tres concentraciones de OU [0, (OU0) 10% (OU10) y 20% (OU 20) MS]. Las fuentes de forraje fueron el ensilaje de maíz y heno mixto, este último constituyendo hasta el 20% de la dieta experimental, el cual fue sustituido progresivamente por OU en las dietas experimentales (Tabla 3.1.1). Todos los ingredientes se molieron a 2 mm (molino de grano Breuer, Chile), se mezclaron y, a continuación, se depositaron 0.5 g de cada sustrato en bolsas filtrantes (Ankom® F57, ANKOM Technology, Macedon, NY, EE.UU.). Se incubaron tres réplicas (técnicas) de cada tratamiento y se realizaron tres corridas (réplicas estadísticas) en semanas consecutivas con tres tiempos de muestreo (6, 12 y 24 h). En total se incubaron 189 frascos [{(2 dietas × 3 niveles de MG × 3 réplicas técnicas) + 3 blancos} × 3 tiempos de muestreo × 3 ejecuciones (réplica estadística)].

Tabla 3.1.1 Ingredientes y composición química (%MS si no se indica algo distinto) de dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje suplementadas con orujo de uva (OU) País a concentraciones de 0, 10% and 20% (base MS).

	OU	Heno mixto	Ensilaje de maíz	AF			BF		
				OU_0	OU_{10}	OU_{20}	OU_0	OU_{10}	OU_{20}
Ingredientes, % of DM									
Heno mixto	-	-	-	20	10	0	20	10	0
Orujo de uva País	-	-	-	0	10	20	0	10	20
Ensilaje de maíz	-	-	-	38	38	38	16	15	15
Harina de maíz	-	-	-	10	13	13	12	16	19
Maíz grano húmedo	-	-	-	10	10	11	22	22	22
Soya	-	-	-	8	8	8	12	12	12
Melaza	-	-	-	3	3	3	5	4	3
Pulpa de remolacha	-	-	-	10	7	6	12	10	8
Vitaminas	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Composición química, %									
Cenizas	10.2	9.5	4.8	6.20	6.1	5.90	6.1	5.4	5.7
Proteína Cruda	9.8	14.4	5.7	13.5	13.3	13.1	15.7	15.5	15.3
Extracto etéreo	10.0	2.0	5.2	1.53	2.0	2.45	1.6	2.2	2.51
FDN	42.6	50.0	54.8	35.1	33.5	33.1	25.2	24.5	23.3
FDA	41.2	37.6	33.3	21.8	19.9	18.4	18.5	16.3	14.5
[1]CNF	32.6	25.5	29.5	43.7	45.1	45.45	51.3	52.4	53.2
[2]Polifenoles totales	18.83	-	-	0.06	0.10	0.13	0.02	0.5	0.78
[3]Taninos condensados	6.89	-	-	0.0	0.5	0.9	0.0	0.5	0.9

[1]Carbohidratos no fibrosos (CNF)= 100 –PC – EE – FDN – Cenizas.
[2]mg de ácido gálico equivalentes/g MS
[3]mg de catequina equivalentes/g MS

Animales y fermentación *in vitro*

Dos horas después de la alimentación de la mañana, se recogió líquido ruminal de distintas partes del rumen de dos vacas Aberdeen Angus adultas no lactantes con una cánula ruminal permanente. Durante los 14 días previos a la inoculación, las vacas fueron alimentadas con una mezcla de heno, grano de maíz y minerales, balanceada para satisfacer las necesidades según su etapa fisiológica, y tuvieron acceso a agua *ad libitum*. El líquido recogido se filtró a través de 4 capas de gasa, se transportó en termos precalentados (39ºC), se infundió con CO_2 para conservar la anaerobiosis y se utilizó en los 15 minutos siguientes a la recogida. El inóculo fue una mezcla 1:3 v/v de líquido ruminal y solución buffer (Menke *et al.* 1979).

El día de la incubación, cada bolsa Ankom® F57 con sustrato fue depositada en una botella de suero ámbar de 50 mL, se añadió 25 mL de inóculo a los frascos, que se cerraron con tapones de goma y se incubaron durante 24 horas a 39°C (Incubadora Form Series II 3110 Water-Jacketed CO_2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) en un agitador orbital ajustado a 90 oscilaciones/min (Heidolph Unimax, Alemania).

Determinación de la producción de CH_4, producción total de gas, pH y desaparición *in vitro* de la materia seca

La producción total de gas (PG) en cada frasco se midió a las 6, 12 y 24 h de incubación, mediante la metodología de desplazamiento de agua (Fedorah y Hrudey 1983). Previamente se recogió una muestra de 15 mL de gas para la determinación de CH_4 en una jeringa y se transfirió a un exetainer vacío de 5.9 mL (Labco Ltd., High Wycombe, Reino Unido). La determinación de CH_4 se realizó mediante cromatografía de gases (CG) (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EE.UU.). El CG estaba equipado con una columna capilar (GS-CarbonPLOT, Agilent Technologies, Italia 30m, 0.32mm, 3.00µm) y un detector de conductividad térmica (TCD). Las temperaturas de la columna, el inyector y el TCD fueron de 35ºC, 185ºC y 150ºC, respectivamente y se utilizó helio como gas portador (20 mL/min). Las concentraciones de CH_4 son presentadas como porcentaje en gas, producción (mg/g de MS) y rendimiento (mg/g de MS digerida).

Al final de la incubación, se midió el pH del medio de cultivo utilizando un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star A121 pH Portable Meter, USA) y las bolsas de filtro Ankom®-F57 se lavaron con agua destilada y se secaron en el horno a 55°C durante 48 h. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso y se presentó como desaparición in vitro de la MS (DIVMS).

Determinación de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles

Se tomaron dos muestras individuales (1.5 mL) de inóculo al inicio de la incubación (0 h) y de cada frasco, después de la medición del pH. Las muestras se transfirieron a frascos de microcentrífuga de 2 mL. Una muestra para la determinación del $N\text{-}NH_3$ se mezcló con 150 µL de ácido tricloroacético (0.65 p/v), se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min a 4ºC y se almacenó a -20ºC hasta su análisis. Las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ se determinaron con un espectrofotómetro UV-VIS (Spectroquant Pharo 300, Merck KGaA, Alemania) a 625 nm, por el método Berthelot modificado según Rhine *et al.* (1998). Una muestra para determinación de las concentraciones de AGV se mezcló con 300 µL de ácido metafosfórico (0.25 p/v), se centrifugó, se filtró (ClarinertTM, 22 µm, Agela Technologies, China) y se almacenó a -20ºC hasta su análisis. Las concentraciones de AGV se analizaron mediante CG (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EE.UU.). El GC estaba equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (30 m × 0,250 mm × 0,25 µm; BD-FFAP, Agilent Technologies, Estados Unidos). La temperatura inicial del horno fue de 150°C, se incrementó en 5°C/min hasta 195°C, se mantuvo durante 5 min y se mantuvo durante 8 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 225°C y 250ºC, y el gas portador fue helio (flujo de 28.5 cm/s). Las concentraciones se determinaron comparando el tiempo de retención y el área de peack con un estándar AGV Supelco mediante el software ChemStation v. 3.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las muestras de la 0 h se utilizaron para calcular el $N\text{-}NH_3$ neto y la producción total neta de AGV.

Análisis químicos

Los análisis químicos de la AOAC, la determinación de los contenidos de polifenoles totales (CPT), y de taninos condensados (TC) realizados al OU y a los sustratos evaluados en este ensayo fueron descritos detalladamente en el punto 2.1 de esta tesis.

Cálculos

Los parámetros de la cinética de la DIVMS se determinaron ajustando los resultados al modelo no lineal de Gompertz (Lavrenčič *et al.* 1997):

$$y = B \exp[-C \exp(-At)]$$

donde "y" es la tasa de DIVMS en un tiempo t, B es la fracción de MS potencialmente degradable, C es la tasa relativa de degradación y A es un factor constante de la eficiencia microbiana.

Los parámetros de la cinética para producción de gas y de CH_4 se determinaron ajustando los resultados obtenidos a la ecuación no lineal de Gompertz (Schofield *et al.* 1994)

$$y = b \exp(-\exp[1-c(t-L)])$$

donde "y" es GP (mL/g MS incubada [MSi]) o CH_4 (mg/g MS incubada [MSi]) después del tiempo t, b es el valor del componente (mL potenciales totales de PG o mg de

CH_4), c es la tasa específica de fermentación y L es el tiempo de retardo (intercepción del eje temporal).

La eficiencia de la fermentación se determinó mediante el factor de partición (FP) a las 24 h de acuerdo con Blümmel *et al.* (1997). Los rendimientos de gas y CH_4 se estimaron como el gas neto (mL) o CH_4 (mg) en cada tiempo de muestreo, dividido por los correspondientes g de MS degradada (MSd).

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, el modelo incluyó el nivel de OU, el tipo de dieta y su interacción como efectos fijos. Para todos los parámetros evaluados, se promediaron las tres réplicas antes del análisis estadístico y esos promedios fueron la unidad estadística. Se realizó una prueba ANOVA, utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} son los datos experimentales; μ es la media global de las observaciones; α_i es el efecto fijo de la inclusión de OU; β_j es el efecto fijo de la dieta (efecto fijo); δ_k es la incubación (efecto aleatorio); $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre dieta × OU, y ε_{ijk} es el error. Las medias se compararon mediante el test de Tukey y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para establecer la relación entre los componentes de la dieta y la producción de gas y CH_4, el N-NH_3 y las concentraciones de AGV. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0{,}05$. Todos los análisis se realizaron utilizando Stata Ver. 15.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

3.1.4 Resultados

Desaparición de materia seca in vitro, cinética de producción de gas y metano

La fracción potencialmente degradable (B) (p<0.001), la tasa de degradación relativa (C; p=0.004) de la DIVMS y la fase lag (L) de PG (p<0.001), así como la producción asintótica de CH_4 (p= 0.018) fueron menores en la dieta AF en comparación con la dieta BF (Tabla 3.1.2). La inclusión de OU redujo ligeramente (4%) la fracción potencialmente degradable (B) de la DIVMS (p=0.006), independientemente de su nivel de inclusión, y la inclusión de OU_{20} generó una reducción del 10% en la producción asintótica de CH_4 (p=0.003).

Tabla 3.1.2. Parámetros de la cinética de desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS), la producción de gas y CH_4 de dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje con inclusión de OU País al 0, 10% and 20% (base MS) a 24 h de incubación.

Items[1]	Dieta		EEM[2] Dieta	Orujo de uva			EEM OU	*p*-valor[3]		
	AF	BF		OU_0	OU_{10}	OU_{20}		D	OU	D × OU
DIVMS										
B (%)	58.53	63.59	0.283	62.38^{A}	60.85^{B}	59.93^{B}	0.347	<0.001	0.006	0.086
C (/h)	1.22	1.35	0.250	1.27	1.29	1.29	0.030	0.004	0.899	0.241
A	0.33	0.36	0.170	0.34	0.34	0.35	0.248	0.387	0.997	0.619
Producción de Gas										
b mL/g MS	128.78	138.54	1.416	139.55^{A}	131.27^{B}	130.17^{B}	1.693	0.003	0.027	0.039
c /h	0.17	0.16	0.005	0.17	0.16	0.16	0.006	0.542	0.066	0.373
L (h)	1.67	2.39	0.943	2.01	2.05	2.05	0.105	<0.001	0.966	0.855
Producción de CH_4										
b mg/g MS	22.87	19.06	0.432	21.45^{A}	20.75^{AB}	19.19^{B}	0.056	0.018	0.003	0.460

c /h	0.15	0.16	0.006	0.14	0.14	0.14	2.853	0.452	0.760	0.066
L (h)	5.91	6.16	0.267	6.09	6.01	5.97	0.286	0.286	0.996	0.078

[A–B] Medias dentro de la misma línea sin un superíndice común difieren

[1]*B*: fracción potencialmente degradable; *C*: tasa de degradación relativa ; *A*: factor de eficiencia microbiana; *b:* producción asintótica; *c:* tasa de producción; *L:* retraso inicial antes de que comience la producción.

[2] Error estándar de la media

[3]D: dieta, OU: orujo de uva, D × OU: interacción dieta × orujo de uva.

Se registró una interacción entre la dieta y el OU (*p*=0.039). En la dieta AF se registró una reducción del 4% en la producción asintótica de gas (b) (Figura 3.1.1) por la inclusión de OU_{20} comparado con la dieta control; entre tanto en la dieta BF, la inclusión de OU_{10} y OU_{20} generaron reducciones del 8 y 11%, respectivamente.

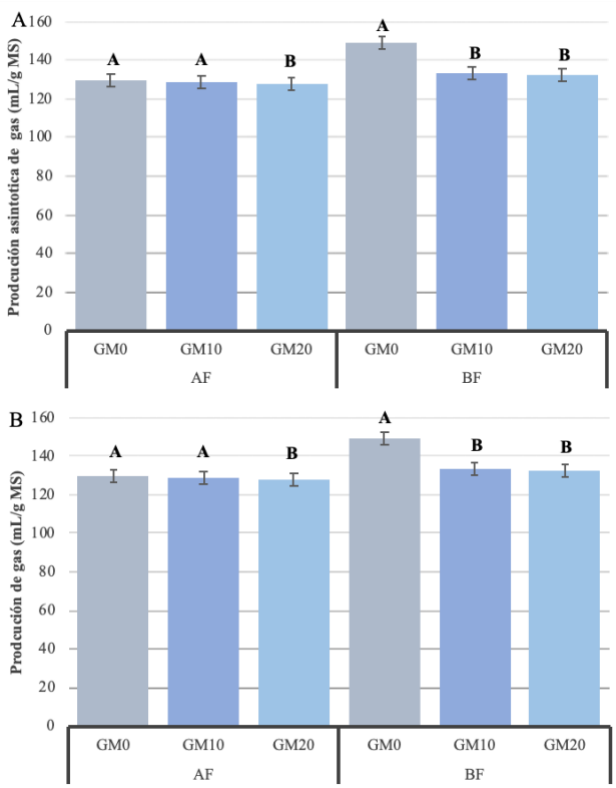


Figura 3.1.1 Interacción dieta × OU en dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje para (A) producción asintótica de gas (mL/g MS) y (B) producción total de gas a las 24 h. Valores de media entre sustratos con letras diferentes difieren (p<0.05)

Parámetros de fermentación a las 24 h

Con la excepción de la producción de N-NH_3 (p=0.108), la dieta afectó todos los parámetros de fermentación, resultando en un incremento de la DIVMS (p<0.001), del FP (p=0.004), de los AGV totales (p=0.001) y los AG de cadena ramificada (AGCR; p=0.015) y en una disminución del pH (p<0.001), la FDN digerida (FDNd; p<0,001), la proporción molar de acetato (p=0.029) y la relación A:P (p=0.023) en las dietas BF en comparación con las dietas AF (Tabla 3.1.3). La FDNd (p=0.934) y el FP (p=0.678) no fueron afectados por la inclusión de OU pero incrementó el pH (p=0.011), el butirato (p<0.001), y redujo la DIVMS (p<0.001), los AGV totales (p=0.001) y la proporción molar de acetato (p=0.029). Se registraron interacciones dieta × OU sobre las proporciones molares de propionato (p=0.027), las proporciones de AGCR (p<0.001) y para la relación acetato-propionato (A:P) (p=0.045; Figura 3.2.2). En la dieta AF, la inclusión de OU_{20} redujo en 13% la proporción de propionato en comparación con AF-OU_0, mientras que para la dieta BF, la inclusión de OU_{10} y OU_{20} redujo las proporciones de propionato en 5% y 8%, respectivamente. La inclusión de OU_{20} redujo la proporción molar de AGCR en 21% en la dieta AF, y en 11% la dieta BF en comparación con sus controles. La inclusión de OU_{20} en la dieta de AF incrementó en 13% la relación A:P en comparación con su dieta de control. Los AGV totales fueron un 8.5% mayores en la dieta BF que en la AF (p<0.001), la inclusión de OU_{20} redujo en un 7% las concentraciones de AGV totales, aunque no hubo efectos por la inclusión de OU_{10}. La inclusión de OU_{20}

redujo la proporción molar de acetato (p=0.029) en 6%, pero aumentó la proporción molar de butirato (p<0.001) según el nivel de inclusión, en 5% con OU_{10} y en 8% con OU_{20} en comparación con OU_0.

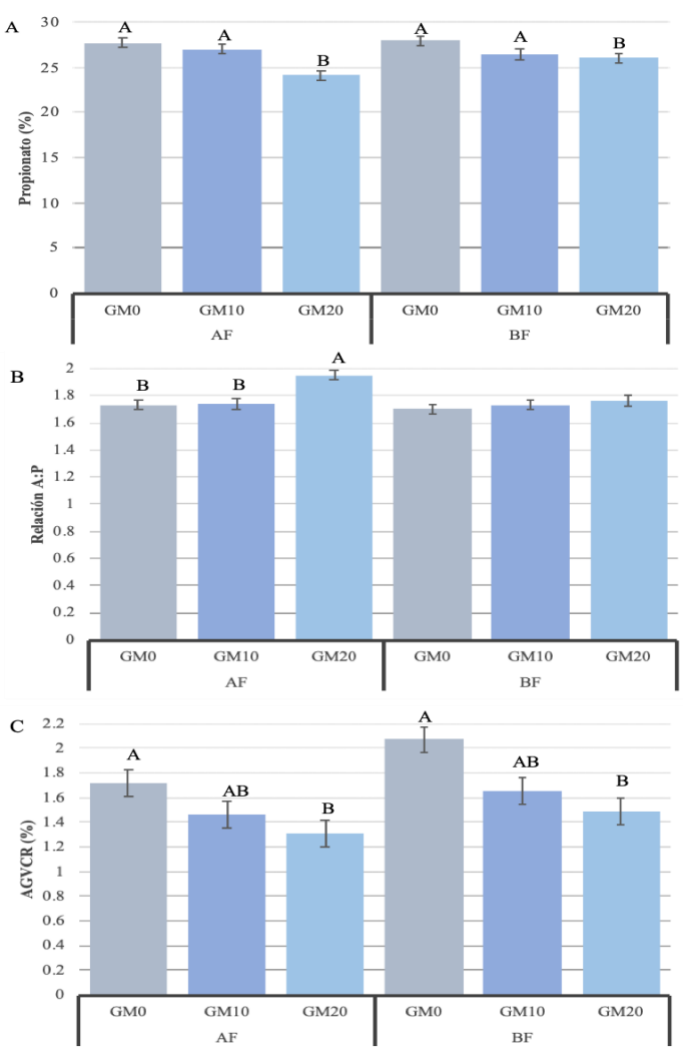


Figura 3.2.2. Interacción dieta × OU en dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje para (A) proporción molar de propionato (%), (B) relación A:P, y (C) proporción molar de ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGCR) (%), a las 24 h. Los valores medios dentro del sustrato sin letras comunes difieren (p<0.05)

La DIVMS para la dieta AF fue 9% menor (p<0.001) comparada con la dieta BF y la inclusión de OU_{20} redujo la DIVMS en un 4.5% en comparación con OU_0. La inclusión de OU_{10} redujo las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ en un 48% mientras que la de OU_{20} redujo en un 58% las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ respecto a las concentraciones de OU_0.

Tabla 3.1.3. Parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* de dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje con inclusión de orujo de uva País a 0, 10% and 20% (base MS) a las 24 h de incubación.

Items[1]	Dieta		EEM[2] Dieta	Orujo de uva			EEM OU	*p*-valor[3]		
	AF	BF		OU_0	OU_{10}	OU_{20}		D	OU	D × OU
pH	6.53	6.45	0.184	6.47^{B}	6.49^{AB}	6.51^{A}	0.013	<0.001	0.011	0.511
DIVMS (%)	57.33	62.67	0.431	58.57^{A}	57.51^{A}	55.90^{B}	0.503	<0.001	<0.001	0.825
FDNd (%)	28.97	21.34	0.803	29.70	29.53	29.31	1.292	<0.001	0.934	0.753
$N\text{-}NH_3$ (mg/dL)	2.99	2.74	0.211	4.20^{A}	2.18^{B}	1.76^{B}	0.450	0.108	<0.001	0.807
FP (mg DMd/mL)	4.65	4.90	0.036	4.70	4.65	4.60	0.066	0.004	0.678	0.072
AGV Totales (m*M*)	154.95	168.10	2.729	167.11^{A}	159.91^{AB}	156.12^{B}	2.543	0.001	0.001	0.502
Acetato (%)	45.31	43.95	0.443	47.01^{A}	44.81^{AB}	44.23^{B}	0.626	0.007	0.029	0.648
Propionato (%)	27.56	27.73	0.412	28.76^{A}	28.10^{AB}	26.06^{B}	0.504	0.187	<0.001	0.027
Butirato (%)	25.37	25.71	0.359	24.56^{B}	25.69^{B}	26.45^{A}	0.424	0.026	<0.001	0.119
AGCR[4] (%)	1.07	1.18	0.023	1.24^{A}	1.03^{AB}	0.87^{B}	0.065	0.015	0.049	<0.001
Relación A:P	1.80	1.73	0.221	1.71^{B}	1.73^{B}	1.85^{A}	0.048	0.023	0.002	0.045

[A–B] Medias dentro de la misma línea sin un superíndice común difieren

[1]DIVMS: desaparición *in vitro* de la materia seca; FDNd: desaparición de la fibra detergente neutra; $N\text{-}NH_3$: nitrógeno amoniacal; FP: factor de partición; AGV: ácidos grasos volátiles; AGCR: ácidos grasos volátiles de cadena ramificada; relación A:P: relación Acetato-propionato

[2]Error estándar de la media

[3]D: dieta; OU: orujo de uva; D × OU: interacción dieta × orujo de uva.

[4]AGCR: iso-valerato + iso-butirato

Producción de gas y metano

Se registró un efecto de la interacción dieta y el OU (p=0.019) sobre la PG total (mL/DM; Figura 3.1.1 B) que no se vio afectada por OU_{10} en la dieta AF. La inclusión de OU_{10} redujo la PG en un 8% para la dieta BF, mientras que la inclusión de OU_{20} redujo la PG en un 4% para la dieta AF y en 11% para la dieta BF, comparadas con sus correspondientes controles.

La producción de CH_4 no fue afectada por la dieta (p=0.163) (Tabla 3.1.4). Sin embargo, las dietas BF presentaron una reducción en el rendimiento de gas (p=0.003), el porcentaje de CH_4 en gas (p<0.001) y la producción de CH_4 (p=0.047), pero incrementaron el CH_4 por g de FDN desaparecida (p<0.001) en comparación con las dietas AF. El OU (20% de MS) redujo el rendimiento de gas (p=0.027), el % de CH_4 en gas en 9% (p=0.038), la producción de CH_4 en 15% (p=0.004) y el rendimiento de CH_4 en un 13% (p=0.027), mientras que la producción de CH_4 expresada por gramo de FND desaparecido no fue afectada (p=0.507).

Tabla 3.1.4. Producción de gas y metano *in vitro* de dietas alta (AF) y baja (BF) en forraje con inclusión de orujo de uva País a 0, 10% and 20% (MS) a las 24 h de incubación.

Items[1]	Dieta		EEM[2] Dieta	Orujo de uva			EEM OU	*p*-valor[3]		
	AF	BF		OU_0	OU_{10}	OU_0		D	OU	D×OU
Gas										

mL/g MS	126.46	131.05	2.17	133.94^{A}	128.44^{B}	123.88^{B}	1.417	0.009	<0.001	0.019
mL/g MSd	213.78	207.81	1.39	214.48^{A}	209.91^{AB}	207.99^{B}	1.704	0.003	0.027	0.126
CH_4										
% gas neto	9.80	7.67	0.348	8.85^{A}	8.77^{A}	8.06^{B}	0.426	<0.001	0.038	0.898
mg/g MS	17.25	16.10	0.56	17.79^{A}	16.84^{AB}	14.99^{B}	0.482	0.047	0.004	0.393
mg/g MSd	27.82	26.59	0.94	28.47^{A}	27.59^{AB}	24.77^{B}	0.749	0.163	0.027	0.199
mg/g FDNd	39.03	56.60	2.37	49.59	48.03	44.88	1.43	<0.001	0.507	0.705

$^{A–B}$ Medias dentro de la misma línea sin un superíndice común difieren
[1]MS: materia seca; MSd: materia seca desaparecida; FDNd: fibra detergente neutra desaparecida
[2] Error estándar de la media.
[3]D: dieta; OU: orujo de uva; D × OU: interacción dieta × orujo de uva

Correlaciones entre la composición química de las dietas y los parámetros de fermentación

Entre todos los factores de composición química de los tratamientos, las concentraciones de TC (r = -0.49, p<0.05) y CPT (r = -0.40, p<0.05) fueron las que presentaron mayor correlación con la concentración de N-NH_3 (Tabla 3.1.5). La DIVMS se correlacionó negativamente con el contenido de FDN (r = -0.49, p<0.001) y CPT (r = -0.34, p<0.05). La producción de gas se correlacionó negativamente con los valores de CPT (r = -0.42, p<0.001) y de TC (r = -0.3, p<0.05). La producción y el rendimiento de CH_4 fueron correlacionadas con ninguno de los componentes de la dieta. Los AGV totales se correlacionaron positivamente con la PC (r = 0.28, p<0.05), pero se correlacionaron negativamente con los valores de CPT (r = -0.37, p<0.05) y los de TC (r = -0.31, p<0.05), mientras que el acetato se correlacionó negativamente con la PC (r = -0.32, p<0.05) y positivamente con la FDN (r = 0.32, p<0.05). El butirato se correlacionó con la ceniza (r = 0.50, p<0.001) y con TC (r = 0.43, p<0.001).

Tabla 3.1.5. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los componentes químicos y los parámetros de fermentación ruminal del tratamiento incubado

Ítem	DIVMS	N-NH_3	Producción		Rendimiento		Ácidos grasos volátiles[1]			
			Gas	CH_4	Gas	CH_4	Total	A	P	B
Cenizas	-0.07	0.32*	-0.35*	0.02	-0.51***	0.15	-0.18	-0.19	-0.24	0.50***
Proteína cruda	0.53***	-0.22	0.28*	0.03	-0.33*	-0.09	0.28*	-0.32*	0.03	0.30*
Fibra detergente neutro	-0.49***	0.28*	-0.31*	0.02	0.22	0.21	-0.25	0.32*	-0.04	-0.20
Contenido de polifenoles totales	-0.34*	-0.40*	-0.42***	-0.13	-0.18	-0.10	-0.37*	-0.06	-0.23	0.37*
Taninos condensados	-0.20	-0.49*	-0.30*	-0.14	-0.19*	-0.18	-0.31*	-0.16	-0.23	0.43***

* = p <0.05 ***= p <0.001, respectivamente.

[1]A= acético, P= propiónico, B= butírico

3.1.5 Discusión

Las interacciones dieta × OU para la producción asintótica de gas y la PG indican que los efectos de la sustitución de una fuente fibrosa como el heno mixto por OU sobre la fermentación ruminal varían según la relación forraje-concentrado de la dieta. La inclusión de OU hasta un 10% de la MS no afectó negativamente los parámetros de PG de la dieta AF, aunque sí de la dieta BF. La reducción de la PG es compatible con la reducción de la DIVMS y de las concentraciones totales de AGV cuando se incluyó OU_{20}. Estos resultados coinciden con informes anteriores en los que se sustituyeron las fuentes fibrosas por OU en dietas forrajeras (Vinyard *et al.* 2018, Caetano *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2022) y para dietas con alto contenido de concentrado (Ishida *et al.* 2015). La reducción de la DIVMS es de baja magnitud en comparación con una reducción del 11% para la digestibilidad de la MS reportada por Caetano *et al.* (2019) para una dieta forrajera y de un 35% reportado por Vinyard *et al.* (2021) para una dieta baja en forraje. A diferencia de

este ensayo, no se reportaron efectos sobre la producción de gas o la DIVMS cuando se incluyó OU hasta un 50% de la MS durante una fermentación *in vitro* de heno (Giller *et al.* 2021). La reducción de la DIVMDS está probablemente relacionada con el aumento de los carbohidratos fibrosos y la lignina con la inclusión de OU en la dieta, aunque también es posible que los TC del OU reduzcan la digestión de los nutrientes al inhibir el crecimiento y la actividad de los microorganismos ruminales, limitando así la actividad de las enzimas microbianas, y la formación de complejos con los carbohidratos y las proteínas (Vasta *et al.* 2019). Adicionalmente, se ha reportado que los taninos condensados tienen una alta afinidad por los polisacáridos de la pared celular y el almidón para formar complejos (Watrelot *et al.* 2020). La adición de OU_{20} a las dietas aumentó sustancialmente el contenido de TC, por lo que es posible que los TC causaran la disminución de la DIVMD por acción sobre los microorganismos fibrolíticos del rumen y la degradación de la pared celular, inhibiendo la producción de gas y CH_4 en el rumen (Vasta *et al.* 2019), lo que podría explicar la reducción de la producción asintótica y la producción total de gas.

La reducción en las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ por la inclusión de OU en este estudio son de mayor magnitud que los resultados previamente reportados para los ensayos de OU bajo condiciones *in vitro* o *in vivo*. Tayengwa *et al.* (2021) informaron una reducción del 12% en las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ por la inclusión del 15% de la MS de OU en una dieta fibrosa, mientras que Ream *et al.* (2021) informaron de reducciones del 15% en las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ por la inclusión OU al 15%MS en una dieta basada en ensilaje, y Hixson *et al.* (2018) informaron de reducciones del 30% en las

concentraciones de N-NH_3 por la inclusión de OU tinto al 30% MS en una dieta baja en fibra. Los resultados en este estudio son consistentes con los reportados para extractos polifenólicos de plantas, con dosis de taninos superiores a las utilizadas en este estudio; como los reportados por Hassanat y Benchaar (2013), con reducciones de N-NH_3 del 62% y 66% en dietas que contenían niveles crecientes de taninos de acacia y quebracho hasta el 20% MS; y Vera *et al.* (2018) que reportaron reducciones de N-NH_3 del 50% con un extracto de corteza de pino (2% de MS) en una dieta forrajera. Esto probablemente es debido al mayor contenido de TC de la uva País (y su OU) en comparación con las variedades comerciales comúnmente reportadas en la literatura.

Los efectos de la interacción dieta × OU sobre los AGCR sugieren un efecto diferencial del OU sobre el metabolismo proteico según el tipo de dieta en la que se incluya. La inclusión de OU_{10} no afectó a la proporción de AGCR. La inclusión de OU_{20} redujo la proporción de AGVCR en ambas dietas, pero la reducción fue casi dos veces mayor en las dietas AF que en las BF. Los AG de cadena ramificada son producto de la fermentación de aminoácidos, por lo es de esperarse una reducción de la proporción de AGCR con una reducción de la producción de N-NH_3. Por lo tanto, los efectos sobre las concentraciones de N-NH_3 pueden ser el resultado de los contenidos de TC presente en el OU. Un efecto diferenciado para taninos incubados en diferentes sustratos fue reportado por Menci *et al.* (2021), quienes encontraron una mayor depresión de la producción de N-NH_3 y de las proporciones de AGCR en heno, que en un pasto alto en proteína por la adición de taninos. Los autores atribuyeron este efecto a las altas concentraciones de

proteína bruta en el pasto, que pueden requerir mayores concentraciones de taninos para producir efectos.

Las interacciones dieta × OU para propionato y para la relación A:P coinciden con Foiklang *et al.* (2016), quienes identificaron una interacción entre el nivel de inclusión de OU y la fuente de fibra dietética. Los cambios en la proporción molar de los AGV totales e individuales registrados en este estudio coinciden con los obtenidos en otros estudios sobre OU (Moate *et al.* 2020, Tayengwa *et al.* 2021, Vinyard *et al.* 2021). Las concentraciones individuales de AGV en este estudio son similares a las reportadas por Oskoueian *et al.* (2013), quienes encontraron que la miricetina y el kaemferol, dos flavonoles principales de la uva, redujeron las concentraciones totales de AGV, las concentraciones de propionato y aumentaron el butirato, así como la proporción A:P, en condiciones *in vitro*. La reducción de los AGV totales e individuales y la DIVMS son de baja magnitud, en comparación con las reducciones reportadas para esos parámetros por estos autores.

Las reducciones en el porcentaje, la producción y el rendimiento de CH_4, son consistentes con informes anteriores. Foikland *et al.* (2016) informaron de una reducción en la producción calculada de CH_4 para OU 20%MS adicionado a fuentes forrajeras en condiciones *in vitro*. Además, se informó previamente de una reducción del 20% en las emisiones de CH_4 al sustituir el 36% de heno de alfalfa por OU en vacas lecheras, sin afectar a la producción (Moate *et al.* 2014). Sin embargo, Moate *et al.* (2020) informaron de una reducción del 15% en las emisiones de CH_4 junto a una reducción del 10% en la producción de leche al sustituir el raigrás perenne fresco por OU. Estos autores

atribuyeron las reducciones al contenido de lípidos, lignina y TC del OU. Los lípidos no se fermentan en el rumen, y cubren la superficie de las partículas de fibra impidiendo la fermentación por parte de los microorganismos, además pueden tener efectos tóxicos sobre los metanógenos y los protozoos, contribuyendo así a reducir la producción de CH_4 (Williams *et al.* 2020). La lignina no se fermenta en el rumen, por lo que no contribuye a la producción ruminal de CH_4, pero puede unirse a los carbohidratos, inhibiendo su degradación enzimática, reduciendo así su fermentación y la producción de CH_4. Pellikaan *et al.* (2011) demostraron en condiciones *in vitro* los efectos antimetanogénicos de los TC presentes en la semilla de uva, sin embargo, recientemente Moate *et al.* (2020) indicaron que los TC del OU no son moléculas antimetanogénicas especialmente potentes. Del mismo modo, Hixson *et al.* (2018) sugirieron un efecto sinérgico de los TC, los ácidos grasos y la lignina. De hecho, las variedades OU con alto contenido de grasa afectan la PG y las concentraciones de AGV, reduciendo así la producción de CH_4, y las variedades OU con mayores concentraciones de taninos de menor peso molecular tienen un mayor potencial antimetanogénico.

Las correlaciones registradas en este estudio entre los principales parámetros de la fermentación ruminal (DIVMS, producción y rendimiento de CH_4), la proteína cruda y la FDN están corresponden a los parámetros normales de la fermentación ruminal. Los polifenoles totales y los TC se correlacionaron negativamente con los productos de fermentación *in vitro* ($N\text{-}NH_3$ y AGV), pero no con la producción de CH_4 ni con el rendimiento. Es posible que la falta de correlación para los parámetros de producción de CH_4, apoye la sugerencia de Hixson *et al* (2018) de un efecto aditivo de los TC y lípidos

sobre los efectos antimetanogénicos del OU. Investigaciones futuras son necesarias para determinar si los efectos del OU sobre la metanogénesis se deben a los polifenoles, a los lípidos o a la combinación de ambos.

Los resultados sugieren que el OU País tiene el potencial de mejorar el uso del nitrógeno por los rumiantes y reducir las emisiones de CH_4, aunque estos resultados dependen del nivel de inclusión. La inclusión del OU País al 10% MS no generó efectos importantes en la mayoría de los parámetros evaluados. Sin embargo, la inclusión de OU 20% MS generó mayores impactos, que parecen depender de la relación forraje-concentrado de la dieta. Son necesarias más evaluaciones para confirmar estos resultados y evaluar la pertinencia del uso de País OU como ingrediente alimenticio para rumiantes.

3.1.6 Conclusión

La sustitución parcial de heno mixto por OU País evaluado en este ensayo hasta un 10% de la MS en dietas altas y bajas en fibra, reduce las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ sin efectos negativos sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro*. La sustitución de fuentes forrajeras por OU País al 20% de la MS redujo la concentración de $N\text{-}NH_3$, así como la producción y el rendimiento de CH_4, como resultado de la reducción de la producción de gas y el porcentaje de CH_4 en gas; y disminuye la DIVMS y los AGV totales. Estos resultados sugieren que OU País tiene el potencial de sustituir parcialmente fuentes fibrosas en la alimentación de rumiantes, añadiendo así valor a un residuo agroindustrial altamente disponible y contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas ganaderos. Sin embargo, falta esclarecer los mecanismos de acción del OU sobre la

partición de nitrógeno, por lo que se justifica la realización de más estudios para entender estos mecanismos y examinar si estos efectos se extienden a las condiciones *in vivo*.

3.2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE FUENTES FIBROSAS POR ORUJO DE UVA PAÍS EN DIETAS PARA RUMIANTES: EFECTOS SOBRE LA DESAPARICION DE NUTRIENTES, PRODUCCIÓN DE METANO Y LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN FERMENTADORES RUSITEC

3.2.1 Resumen

La uva País, variedad tradicional chilena se caracteriza por un alto contenido de taninos, el OU derivado de esta podría reducir las emisiones de metano (CH_4) y la excreción de nitrógeno reactivo de la ganadería. Se evaluó los efectos de la inclusión de OU País al 20% MS en dietas para rumiantes altas (AF) y bajas (BF) en forraje sobre los parámetros de fermentación, producción de CH_4 y las poblaciones microbianas ruminales, mediante un experimento con diseño factorial 2 × 2, cuatro tratamientos (dietas AF y BF, cada una con y sin OU) en un sistema de fermentación Rusitec de 8 fermentadores, en incubaciones de 16 días. El OU sustituyó parcialmente el heno mixto en la dieta AF, y completamente al ensilaje de maíz en la dieta BF. Las poblaciones de bacterias totales, principales bacterias fibrolíticas, hongos totales y de metanógenos fueron evaluadas por qPCR. La desaparición *in vitro* de la MS, FDN y FDA de la dieta AF no fueron afectadas, sin embargo, la inclusión de OU redujo la DIVMS (p=0.011) y la desaparición de FDA (p=0.004), las poblaciones de *Fibrobacter succinogenes* (p=0.006) y *Ruminococcus flavefaciens* (p=0.001) en la dieta BF. La inclusión de OU (p <0.001) redujo la

desaparición de la proteína y la producción de N-NH_3 (p<0.001), el rendimiento de CH_4 y las poblaciones de metanógenos (p=0.001) en las dos dietas evaluadas. El OU País 20% MS puede reducir la degradación de la proteína, la producción de N-NH_3 y las emisiones de CH_4, en dietas AF sin comprometer la digestión de nutrientes, pero su inclusión en dietas BF puede reducir la DIVMS y la desaparición de fibra.

Palabras clave: residuos vinícolas, fibra, qPCR, amoniaco, rumiantes

3.2.2 Introducción

Los sistemas de producción ganadera contribuyen significativamente con las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), se estima que el sector contribuye con entre el 9% y el 11% de las emisiones antropogénicas globales de CH_4 (Pickering *et al.* 2015), y con el 60% de las emisiones globales de amonio (NH_3) (Uwizeye *et al.* 2020). Este escenario ha intensificado la búsqueda de estrategias de mitigación de los GEI, enfatizando en la reducción de las emisiones de CH_4, especialmente para dietas altas en fibra, que estimulan la producción de CH_4 al incrementar los ácidos acético y butírico, y reducir el propionato durante la fermentación ruminal (Jayanegara *et al.* 2018).

Se espera un déficit de alimentos para el ganado como consecuencia del cambio climático, con una mayor amenaza para la producción ganadera basada en el forraje (Moorby y Fraser, 2021) y un incremento en la oferta de dietas concentradas a futuro es improbable debido a conflictos por el uso de la tierra para la alimentación humana y la producción de bioenergía (FAO, 2017), lo que hace necesario considerar fuentes alternativas para la alimentación animal. Los residuos y subproductos de la agroindustria y la industria alimentaria representan riesgos ambientales y problemas de gestión (Klein *et al.* 2021). Sin embargo, una alta proporción de estos es rico en nutrientes, lo que los hace potencialmente útiles para la alimentación animal, reduciendo costos de producción (Lourenco *et al.* 2016). Algunos subproductos como el orujo de uva (OU) contienen

cantidades considerables de compuestos bioactivos, como los taninos, cuyos efectos sobre las emisiones de CH_4 (Hixson *et al.* 2016), el metabolismo del nitrógeno y su excreción (Greenwood *et al.* 2012) y las propiedades químicas y nutricionales de los productos animales (Ianni *et al.* 2019) han sido demostrados. El OU posee además altos contenidos de fibra y como muchos de los subproductos es de bajo costo, haciéndolo potencialmente útil como ingrediente alternativo para la alimentación de rumiantes. Sin embargo, la gran variabilidad en su composición hace necesario evaluar su potencial nutricional, tolerancia y asimilación por los animales, así como los efectos de su asociación con otros ingredientes (Babău *et al.* 2019).

Estudios previos han evaluado los efectos del uso de OU en dietas para rumiantes sobre los rendimientos productivos (Moate *et al.* 2020, Tayengwa *et al.* 2021), la producción de CH_4 entérico (Russo *et al.* 2017, Hixson *et al.* 2018) y los efectos en la calidad de los productos finales (Buffa *et al.* 2020a, Vieira *et al.* 2022). Sin embargo, información sobre los efectos del OU sobre parámetros de la fermentación ruminal y las poblaciones microbianas es limitada (Buffa *et al.* 2020b, Barraso *et al.* 2021). Además, los resultados de investigaciones previas son ampliamente variables, debido a la diversidad de fuentes del OU, las especies y grupos animales utilizados, el nivel de inclusión en la dieta, el tipo de dieta y el ingrediente alimentario sustituido (Corredu *et al.* 2020).

Los resultados del estudio 3.1 (Suescún-Ospina *et al.* 2022) demostraron que la inclusión de OU País hasta un 20% MS en dietas para rumiantes en condiciones *in vitro* (*batch*), reduce la producción de CH_4, y las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ sin afectar

negativamente la fermentación ruminal. Sin embargo, en ese ensayo no fue posible dilucidar los mecanismos por los cuales el OU País afecta la metanogénesis, o reduce la producción de N-NH_3, así como sus efectos sobre la digestibilidad de los nutrientes y las poblaciones microbianas de rumen. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la inclusión de OU País al 20% MS en dietas con alto y bajo contenido de forraje sobre los parámetros de fermentación ruminal, la producción de CH_4, la digestibilidad de nutrientes y las principales poblaciones microbianas del rumen en un sistema de fermentación semicontinuo Rusitec.

2.2.6 Materiales y métodos

Diseño experimental, inóculo ruminal y tratamientos

Se realizó un experimento *in vitro* basado en un diseño factorial 2 × 2 de cuatro tratamientos usando un equipo de fermentación semicontinuo de 8 fermentadores (Rusitec). Cada tratamiento se evaluó en dos réplicas, durante dos períodos experimentales de 16 días. Las muestras se tomaron entre los días 10 y 15 de incubación. Se formularon dos dietas experimentales para rumiantes (relación forraje-concentrado 60:40 (AF) y 35:65 (BF) usadas como control, adicionalmente se incluyó OU País en las dietas AF y BF, sustituyendo una fuente de fibra, hasta alcanzar el 20% MS de la dieta. En la dieta AF, el OU sustituyó el 70% del heno mixto y en la dieta BF el OU sustituyó el 100% del ensilaje de maíz. Con el fin de obtener contenidos similares de FDN y PC en las

dietas con OU y control, se ajustaron las concentraciones de otros ingredientes debido a que el FDN de OU País es inferior que las del heno mixto y el ensilaje de maíz (FDN 42.7%, 49.9% y 54.8%, respectivamente). Los ingredientes y la composición química de las dietas experimentales se presentan en la Tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1 Ingredientes y composición química (g/kg MS si no se indica algo distinto) de las dietas experimentales incubadas en fermentadores Rusitec

Ítem	**OU**	**Tratamiento**			
		AF	**AFOU**	**BF**	**BFOU**
Ingrediente					
Heno mixto		325	100	-	-
Heno de alfalfa		375	400	200	200
Ensilaje de Maíz		-	-	200	-
Orujo de uva		-	200	-	200
Maíz grano húmedo		118	145	194	235
Harina de soya		22	45	118	105
Avena		150	100	278	250
Minerales		10	10	10	10
Composición química					
Materia seca, g/kg materia fresca	944.5	933	926	934	922
Materia orgánica	934.1	847	833	888	857
Proteína cruda	99.8	150.6	151.1	160.3	161.2
Extracto etéreo	98.2	15.3	25.5	16.6	26.9
Fibra detergente neutro	414.7	407.1	397.2	286.3	272.2
Fibra detergente ácido	422.1	313.8	316.7	179.1	176.1
Carbohidratos no fibrosos	290.8	341	334.2	490.8	477.7
Polifenoles totales (AG-eq/g MS)	18.4	-	-	-	-
Taninos condensados (CAT-eq/kg MS)	68.9	0.4	16.0	0.3	15.7

Nota: OU: orujo de uva AF: Alta en forraje; BF: baja en forraje; AFOU: dieta AF con OU 20%MS; BFOU: dieta BF con OU 20% MS.
Perfil de ácidos grasos del OU País: C16:0, 8.81%; C18:0, 6.63%; C20:0, 2.22%; C18:1, 21.89 %; C18:2: 60.45 %, como % de los ácidos grasos totales.

Orujo de uva País

El origen, procedimientos de secado y conservación del OU País es descrita a detalle en el estudio 2.2 de esta tesis.

Animales y fermentación *in vitro*

La descripción de los animales donadores y su manejo, la colección y procesamiento del licor ruminal fueron descritos en el estudio 3.1. Simultáneamente a la colección de líquido ruminal, se colectó digesta solida de distintas partes del rumen, la cual fue transportada y procesada en iguales condiciones que el líquido ruminal.

Procedimiento de incubación

El día de incubación (día 1), cada fermentador se llenó con 200 mL de buffer McDougall (1948) y 800 mL de líquido ruminal. Además, cada fermentador recibió dos bolsas de poliéster (tamaño de poro 50 µm; Ankom technology corp., Macedon, EE.UU.), una con 40 g de digesta sólida y otra con 10 g del tratamiento correspondiente, asignado al azar a cada fermentador. A las 24 h de incubación, las bolsas de digesta sólida fueron sacadas y sustituidas por bolsas con el tratamiento correspondiente. Cada fermentador se infundió permanentemente con buffer McDougall a una tasa de 2.9% durante todo el periodo experimental. Los gases generados se recogieron en bolsas reutilizables de colección de orina (2 L de capacidad) unidas a un matraz Erlenmeyer (2 L) para recoger los efluentes líquidos de cada fermentador. Los gases y la producción de efluentes se midieron diariamente.

Desaparición de nutrientes, producción de gas y parámetros de fermentación

Desde el día 10 hasta el día 15 de incubación se determinó la desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Luego de 48 h de incubación, las bolsas fueron retiradas, lavadas con agua desionizada hasta que está no contenía residuos visibles, y secadas en horno a 55°C durante 48 h. La DIVMS se calculó sobre la base de la materia seca residual. Los residuos se agruparon por fermentador y se molieron a través de un tamiz de 1 mm para su análisis químico. Diariamente, durante el intercambio de bolsas se midió la producción de gas (PG) utilizando un aparato de desplazamiento de agua (Fedorah y Hrudey, 1983). Previo a la medición, de cada bolsa se recogió una muestra de 15 mL, que se transfirieron a un exetainer vacío de 5.9 mL (Labco Ltd., High Wycombe, Reino Unido), el cual se mantuvo a temperatura ambiente hasta evaluación. El pH del líquido ruminal se registró antes de su depósito en los fermentadores (el día 1), y el pH del medio de fermentación se registró diariamente, con un medidor portátil de pH (Thermo Scientific, Orion Star A121 pH Portable Meter, USA). Se recogieron diariamente muestras del efluente de cada fermentador para determinar los contenidos de ácidos grasos volátiles (AGV) y de nitrógeno amoniacal ($N\text{-}NH_3$), de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 3.1.

Extracción de ADN y ensayo qPCR

Para evaluar los cambios en las poblaciones microbianas asociadas al líquido (LAM, del inglés "*liquid associated microorganisms*") y al sólido (SAM, del inglés "*solid associated microorganisms*") durante la fermentación, se tomaron muestras individuales de líquido (10 mL) y de sólido (10 g) de cada uno de los vasos de fermentación en los días 5 y 16 de incubación. Las muestras sólidas fueron inmediatamente congeladas y almacenadas a -80 ºC hasta su procesamiento. Las muestras fluidas se centrifugaron dos veces a 10.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, el pellet formado se lavó con buffer fosfato (BTS), se centrifugó de nuevo y se descartó el sobrenadante. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. El ADN de las muestras microbianas de LAM y SAM (300 mg) se extrajo utilizando el kit ADN de tejidos E.Z.N.A.® (Omega Bio-Tek, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El volumen de elución del ADN fue de 150 µL. La calidad y el rendimiento del ADN se determinaron utilizando un lector de microplacas Epoch 256695 (BioTek, Vermont, USA) y la concentración final de ADN de los extractos se ajustó a 10 ng/µL para todos los análisis. Se utilizaron oligonucleótidos sintetizados químicamente por Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT; Coralville, IA), según secuencias reportadas previamente (Tabla 3.2.2). El análisis de PCR cuantitativo (qPCR) se realizó por triplicado utilizando un sistema qPCR Mx3000p (Stratagene, La Jolla, CA). La eficiencia global de amplificación (Es) se determinó a partir de la pendiente de las curvas estándar utilizando la ecuación: Es = 10^(-1⁄slope) - 1, según Denman y McSweeney (2006). Cada mezcla de reacción de

PCR (20 µl de volumen final) contenía 10 µl de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Estados Unidos), 0.5 µl de 25 µM de cada primer directo e inverso, 5 µl de agua miliQ y 4 µl de ADN extraído. Un control negativo (agua destilada estéril) fue evaluado en cada placa para detectar contaminación o la formación de dímeros. La amplificación se realizó con el programa: 95°C durante 15 minutos para desnaturalización, 40 ciclos a 94°C por 60 s y 60°C por 60 s. Se realizó la cuantificación absoluta de bacterias y hongos totales mediante qPCR basada en el método de la curva estándar, utilizando ADN extraído de pellets microbianos de los tratamientos control (0.0001-10 ng/mL). Para calcular la concentración de ADN total (ng/g MS) expresada como Log10, se utilizó la ecuación:

$$log_{10} \text{ ng ADN} = \frac{\text{SQ mean} * \text{C} * \text{DV}}{\text{S} * \text{P}}$$

Donde,

SQ mean es el número medio de copias cuantificadas durante la amplificación,

C es la concentración de ADN de la muestra,

DV es el volumen de dilución del ADN extraído

S es la cantidad de ADN (ng) utilizada en el análisis

P es la cantidad (mg) de contenido ruminal utilizada en la extracción.

El método 2-ΔΔCt se utilizó para el análisis de la expresión génica relativa de los metanógenos totales, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y Prevotella spp. Las bacterias totales sirvieron de

estándar interno dada su mayor abundancia, Ct representa el ciclo umbral después de corregir las diferencias en las eficiencias de amplificación entre el objetivo y las bacterias totales.

Tabla 3.2.2. Primers usados en el ensayo qPCR

Objetivo	Secuencia	Temperatura de annealing (ºC)	Tamaño (bp)	Referencia
Bacterias totales	F CGGCAACGAGCGCAACCC R CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	60	145	Denman & MCSweeney 2006
Hongos totales	F GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	55	120	Denman & MCSweeney 2006
Metanogenos totales	F TTCGGTGGATCACARAGAGC R GBAAGTCGTATCCGTAGAATCC	60	140	Denman & MCSweeney 2006
Fibrobacter succinogenes	F GGTATGGGATGAGCTTGC R GCCTGCCCCTGAACTATC	60	446	Tajima *et al.* 2001
Butirivibrio fibrisolvens	F GCCTCAGCGTCAGTAATCG R GGAGCGTAGGCGGTTTTAC	55		Stevenson & Weimer (2007)
Ruminococcus albus	F CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG. R CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55	175	Koike & Kobayashi (2001)
Ruminococcus flavefasciens	F CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG. R CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	55	132	Denman & MCSweeney 2006
Prevotella spp	F CACGGTAAACGTGGAT R GGTCGGGTTGCAGACC	55	534	Matsuki *et al.* (2002)

Nota: F: forward; R: reverse.

Análisis químico

Muestras de los tratamientos y de los residuos de la fermentación fueron molidos (molino de grano, Breuer, Temuco, Chile) a través de un tamiz de 1 mm para su análisis de acuerdo con los análisis descritos en el estudio 2.1 de esta tesis. Las concentraciones de AGV y la producción de N-NH_3 (mmol/L) obtenidos fueron multiplicados por el

volumen de efluente (L/día) para estimar la producción diaria de AGV y $N\text{-}NH_3$, expresadas en mmol/día.

3.2.3 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para un arreglo factorial de medidas repetidas para analizar las características de fermentación, con el tratamiento (dieta y OU), el período de incubación, el día y la interacción dieta × día como efectos fijos, y el fermentador como efecto aleatorio; utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \delta_k + (\alpha\delta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} es cada observación de la unidad experimental (de cada fermentador); μ es la media general; β_i es la incubación (efecto aleatorio); α_j es la concentración de OU (efecto fijo); δ_k es el efecto de la dieta (efecto fijo); $(\alpha\delta)_{jk}$ es la interacción entre ambos factores; y ε_{ijk} es el error experimental. Las estructuras de covarianza para este análisis se determinaron basándose en el valor mínimo del criterio de información de Akaike. Se compararon medias mediante la prueba de Tukey, declarando significancia cuando $p<0.05$. Los resultados se presentan como valores medios y el error estándar de la media.

Los datos del análisis molecular se transformaron a porcentaje como $(2\text{-}\Delta\Delta CT) \times 100$ y luego a escala $\log_{10}$ antes del análisis estadístico de acuerdo con Liang *et al.* (2017).

Se realizó ANOVA de una vía factorial para la evaluación de los cambios en la abundancia relativa de cada una de las poblaciones microbianas de acuerdo al modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\delta)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} es cada grupo microbiano; μ es la media general; α_j es el efecto del tratamiento; β_j es el efecto del día de muestreo (5 o 16); $(\alpha\beta)_{jk}$ es la interacción entre el tratamiento y el día de muestreo; y ε_{ijk} es el error experimental. Se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias y se declararon diferencias cuando $p<0.05$. El índice de diversidad de Shannon del microbioma bacteriano se calculó utilizando Microsoft Excel (Microsoft Office 365).

3.2.4 Resultados

Desaparición de nutrientes y parámetros de fermentación ruminal

Los resultados de la desaparición *in vitro* de nutrientes y los parámetros de fermentación son presentados en la Tabla 3.2.3. No se registró interacción entre la dieta y la inclusión de OU sobre la desaparición *in vitro* de la MS, la FDA, el pH, las concentraciones de N-NH_3 o las proporciones molares de butirato. Sin embargo, se detectó dicha interacción para la desaparición *in vitro* de FDN (p=0.012) y de la proteína cruda (p=0.010). La desaparición *in vitro* de la FDN fue reducida un 24.7% con la inclusión de OU en la dieta BF, aunque no hubo efectos de la inclusión a la dieta AF. La desaparición

in vitro de la proteína cruda fue reducida en 7% por la inclusión de OU en la dieta AF y en 12.7% por la inclusión de OU en la dieta BF. La DIVMS fue menor para la dieta AF que para la dieta BF (p<0.001), así mismo, la inclusión de OU (p=0.011) redujo la DIVMS de la dieta BF, pero no la correspondiente a la dieta AF.

La producción diaria de N-NH_3 (p<0.001) fue reducida en 21.8% y 20.8% por la inclusión de OU en las dietas AF y BF, respectivamente. La producción total de AGV (p=0.010) y la proporción molar de acetato (p=0.016) fueron afectadas por la interacción entre la dieta y la inclusión de OU. Aunque la producción total de AGV fue mayor en las dietas BF, no hubo diferencias por la inclusión de OU. La producción molar de acetato fue mayor en las dietas AF, que en las dietas BF, pero no hubo efectos de la inclusión de OU. Las proporciones molares de butirato (p=0.014), ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGCR, p=0.024) y la relación acetato-propionato (p=0.037) fueron afectadas por la relación entre la dieta y la inclusión de OU. No se registraron diferencias por la inclusión de OU en la dieta AF, sin embargo, la inclusión de OU en la dieta BF redujo la proporción de propionato y de AGCR e incrementó la relación A:P.

Tabla 3.2.3. Desaparición de nutrientes (% MS) y parámetros de la fermentación ruminal de dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje, y tratamientos con orujo de uva (OU, 20% base MS) en fermentadores Rusitec

Ítem	**Tratamiento**				**EEM**	***p*-Valor**		
	AF	**AFOU**	**BF**	**BFOU**		**D**	**OU**	**D×OU**
DIVMS	55.9^{B}	55.5^{B}	66.8^{A}	62.8^{B}	0.09	<0.001	0.011	0.090
FDN	26.4^{A}	23.9^{AB}	24.2^{A}	18.2^{B}	1.58	0.064	0.187	0.012
FDA	27.4^{A}	24.9^{AB}	24.5^{A}	21.0^{B}	0.89	<0.001	0.004	0.526

CP	65.2^{A}	60.7^{B}	65.7^{A}	57.3^{B}	1.03	<0.001	<0.001	0.010
pH	7.3^{A}	7.3^{BC}	7.2^{B}	7.7^{C}	0.02	<0.001	0.008	0.413
N-NH_3 (mmol/día)	7.8^{A}	6.1^{B}	7.7^{A}	6.1^{B}	0.06	0.218	<0.001	0.161
AGV Totales (mmol/día)	60.9^{B}	62.3^{B}	72.6^{A}	75.7^{A}	0.85	<0.001	0.003	0.010
Proporciones molares (mol/100 mol)								
Acetato	63.8^{A}	63.0^{A}	60.8^{B}	60.5^{B}	0.78	<0.001	0.147	0.016
Propionato	29.5^{AB}	28.9^{AB}	30.2^{A}	27.9^{B}	0.46	0.471	0.015	0.014
Butirato	6.8^{B}	6.94^{B}	8.0^{A}	8.01^{A}	0.35	<0.001	0.141	0.424
AGCR	2.2^{A}	2.04^{A}	2.2^{A}	1.8^{B}	0.09	0.071	<0.001	0.024
Relación A:P	2.2^{A}	2.18^{A}	2.0^{B}	2.2^{A}	0.05	0.010	0.079	0.037

Nota: EEM: error estándar de la media; FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, CP: proteína cruda, N-NH_3: nitrógeno amoniacal, AGV: ácidos grasos volátiles, AGVRC: ácidos grasos de cadena ramificada: iso-valerato + iso-butirato. D: dieta, OU: orujo de uva, D×OU: interacción dieta y orujo de uva.
$^{A-B}$ Dentro de las filas, medias sin un superíndice común difieren ($p < 0.05$).

Producción total de gas y metano

La producción diaria de gas (p<0.001) y la producción acumulada de gas (p=0.049) fueron afectadas por la dieta, pero no por la inclusión de OU (Tabla 3.2.4). Igualmente, la producción diaria de CH_4 (p<0.001) y la producción de CH_4 (p<0.001) fueron afectadas por la dieta, pero no por la inclusión de OU. Entre tanto, el rendimiento de CH_4 (mg/g MS desaparecida) fue reducido en 18% en la dieta AF y en 14% en la dieta BF por efecto de la inclusión de OU (p=0.001).

Tabla 3.2.4. Producción de gas y metano (CH_4) en dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje y tratamientos con orujo de uva (OU, 20% base MS) en fermentadores Rusitec

Ítem	**Tratamiento**				**EEM**	***p*-Valor**		
	AF	**AFOU**	**BF**	**BFOU**		**D**	**OU**	**D×OU**
Producción total de gas (L/día)	1.41^{B}	1.43^{AB}	1.64^{A}	1.61^{A}	0.051	<0.001	0.625	0.669

Gas acumulado (L/g MS desaparecida)	0.57^{B}	0.55^{B}	0.63^{A}	0.62^{A}	0.009	0.049	0.290	0.344
Producción de metano								
CH_4, mg/día	26.11^{B}	25.27^{B}	37.23^{A}	34.42^{A}	1.66	<0.001	0.098	0.579
CH_4, mg/g MS incubada	3.36^{AB}	2.90^{B}	4.26^{A}	4.02^{AB}	0.281	<0.001	0.056	0.207
CH_4, mg/g MS desaparecida	6.75^{A}	5.55^{B}	6.38^{A}	5.47^{B}	0.194	0.056	0.001	0.225

Nota: EEM: error estándar de la media; D: dieta, OU: orujo de uva, D×OU: interacción dieta y orujo de uva. $^{A-B}$ Dentro de las filas, medias sin un superíndice común difieren ($p < 0.05$).

Abundancia absoluta y relativa de las poblaciones microbianas

Los efectos de los tratamientos sobre la abundancia absoluta de bacterias y hongos totales se presentan en la Tabla 3.2.5. La interacción entre el día de muestreo y la inclusión de OU afectó el número de copias de los genes de bacterias totales (p<0.001) y hongos totales (p<0.001) en las muestras de microbios asociados a la fase líquida (LAM) y la fase sólida (SAM). No hubo diferencias entre tratamientos el día 5 de incubación, sin embargo, el día 16 de incubación se registró un incremento del número de copias de los genes de bacterias totales y de hongos totales en las muestras SAM para los dos tipos de dieta. Por su parte, en las muestras LAM se registró una reducción en el número de copias de los genes de bacterias totales de las dietas AFOU y BFOU, así como en el número de copias de los genes de hongos totales correspondientes a las dietas BFOU.

Tabla 3.2.5. Cambios en el DNA de bacterias y hongos totales (log_{10} concentración de ADN [ng/g MS]) en muestras sólidas (SAM) y líquidas (LAM) de fermentadores Rusitec, alimentados con dietas altas (AF) y bajas (BF) en forraje y tratamientos con orujo de uva (OU) País.

	Día 5				**EEM**	**Día 16**				**EEM**	**p-Valor**		
	Tratamiento					**Tratamiento**							
	AF	**AFOU**	**BF**	**BFOU**		**AF**	**AFOU**	**BF**	**BFOU**		**OU**	**Día**	**D×OU**
SAM													
Bacterias totales	16.03^{B}	16.07^{B}	15.60^{C}	15.83^{C}	0.123	16.34^{B}	16.68^{A}	15.93^{BC}	16.79^{A}	0.220	<0.001	0.059	<0.001
Hongos totales	0.078^{B}	0.078^{B}	0.076^{C}	0.075^{C}	0.143	0.079^{B}	0.083^{A}	0.080^{B}	0.083^{A}	0.002	<0.001	0.217	<0.001
LAM													
Bacterias totales	6.68^{A}	6.35^{A}	6.08^{AB}	6.31^{A}	0.712	5.34^{AB}	4.98^{C}	5.18^{B}	5.09^{BC}	0.072	<0.001	0.215	<0.001
Hongos totales	0.08^{A}	0.08^{A}	0.08^{A}	0.08^{A}	0.021	0.07^{AB}	0.07^{AB}	0.07^{AB}	0.06^{B}	0.002	<0.001	0.198	<0.001

Nota: EEM: error estándar de la media; D: día de muestreo, OU: orujo de uva; OU×D: orujo de uva × día; SAM: microbios asociados a sólidos; LAM: microbios asociados a líquido. $^{A-C}$ Dentro de las filas, medias sin un superíndice común difieren ($p < 0.05$).

La interacción entre el día de muestreo y la inclusión de OU afectó la abundancia relativa de todas las poblaciones de microorganismos en las muestras SAM de los tratamientos evaluados y las poblaciones de metanógenos totales de las muestras LAM (Tabla 3.2.6). La inclusión de OU a las dietas generó una reducción de las poblaciones de metanógenos totales en las muestras SAM (p=0.007) y LAM (p=0.045) de las dos dietas el día 16 de incubación. Igualmente, se registró reducción en las poblaciones de *Fibrobacter succinogenes* en las muestras SAM (p=0.006) de las dos dietas, pero no en las muestras LAM. Las poblaciones de *Ruminococcus flavefaciens* (p<0.001) fueron reducidas en las muestras SAM de la dieta BFOU, pero no en la dieta AFOU. Las poblaciones de *Butyrivibrio fibrisolvens* (p=0.009) se incrementaron en las muestras de la fase sólida de las dos dietas. Las poblaciones de *Ruminococcus albus* (p=0.006) se incrementaron por efecto de la inclusión de OU (p=0.017) en las dos dietas respecto a las dietas control, indistintamente del día de muestreo. El índice de Shannon, (indicador de la diversidad del microbioma) de las muestras SAM de las dietas con OU fue incrementado el día 16 de incubación (p=0.015).

Tabla 3.2.6. Abundancia relativa (% de bacterias totales) de los microorganismos de interés en muestras sólidas y líquidas de fermentadores Rusitec alimentados con dietas altas y bajas en forraje, sin (AF, BF) y con inclusión de orujo de uva País (AFOU, BFOU)

	DIA 5				DIA 16				EEM	P-valor		
	Tratamiento											
	AF	AFOU	BF	BFOU	AF	AFOU	BF	BFOU		OU	Día	OU×Dia
SAM												
Metanogenos totales	1^{A}	0.07^{B}	1^{A}	0.06^{B}	1^{A}	0.01^{C}	1^{A}	0.02^{C}	0.015	0.000	0.001	0.007
Butyrivibrio fibrisolvens	1^{C}	1.48^{C}	1^{C}	4.53^{B}	1^{C}	6.05^{B}	1^{C}	8.37^{A}	1.212	0.007	0.016	0.009
Ruminococcus flavefaciens	1^{A}	0.45^{B}	1^{A}	0.18^{B}	1^{A}	0.34^{B}	1^{A}	0.08^{C}	0.008	0.008	0.001	<0.001
Fibrobacter succinogenes	1^{B}	5.56^{A}	1^{B}	5.15^{A}	1^{B}	0.56^{B}	1^{B}	0.45^{B}	1.101	0.000	0.001	0.006
Ruminococcus albus	1^{C}	6.19^{A}	1^{C}	2.43^{B}	1^{C}	9.42^{A}	1^{C}	2.03^{B}	0.490	0.017	0.009	0.006
Prevotella spp.	1^{C}	2.78^{B}	1^{C}	6.53^{A}	1^{C}	2.33^{B}	1^{C}	5.06^{A}	0.748	0.002	0.017	0.009
LAM												
Metanogenos totales	1^{A}	0.04^{B}	1^{A}	0.04^{B}	1^{A}	0.02^{C}	1^{A}	0.01^{C}	0.064	0.050	0.002	0.045
Butyrivibrio fibrisolvens	1	0.88	1	0.96	1	0.97	1	0.61	0.109	0.056	0.191	0.175
Ruminococcus flavefaciens	1^{A}	0.09^{B}	1^{A}	0.02^{C}	1^{A}	0.11^{B}	1^{A}	0.01^{C}	0.007	0.000	0.000	0.115
Fibrobacter succinogenes	1^{B}	2.08^{A}	1^{B}	2.02^{A}	1^{B}	2.08^{A}	1^{B}	2.01^{A}	0.096	0.000	0.000	0.963
Ruminococcus albus	1^{C}	3.36^{A}	1^{C}	3.20^{A}	1^{C}	3.01^{B}	1^{C}	3.05^{AB}	0.194	0.027	0.086	0.501
Prevotella spp.	1^{B}	0.50^{B}	1^{B}	4.87^{A}	1^{B}	0.01^{C}	1^{B}	3.33^{A}	0.544	0.004	0.002	0.061

Nota: OU orujo de uva, OU×Dia: interacción entre el contenido de OU y el día de muestreo

Ruminococcus albus, *Fibrobacter succinogenes* y Prevotella spp. fueron las poblaciones más abundantes en las muestras SAM de la dieta AFOU el día 5 de incubación, un cambio fue registrado el día 16 de incubación, por el incremento en las poblaciones de *Butyrivibrio fibrisolvens* y una reducción de las poblaciones de *F. succinogenes*. Para la dieta BFOU, las poblaciones dominantes en las muestras SAM el día 5 de incubación fueron Prevotella spp., *Fibrobacter succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, con un incremento de la población de *Butyrivibrio fibrisolvens*, y una marcada disminución de las poblaciones de *Fibrobacter succinogenes* el día 16 de incubación.

DISCUSIÓN

La falta de efectos en la DIVMS y la PG registrados en este estudio para la dieta alta en forraje con OU concuerdan con fermentaciones *in vitro* de OU reportadas por Giller *et al.* (2021). De otra parte, la reducción en la DIVMS de registrada para la dieta baja en forraje con OU coincide con resultados previos de estudios realizados con OU en condiciones *in vivo* (Caetano *et al.* 2019; Vinyard *et al.* 2021). Los efectos sobre la desaparición de FDN o FDA parecen ser dependientes del tipo de dieta. Estudios previos con OU en condiciones *in vivo* (Juráček *et al.* 2021, Tayengwa *et al.* 2021), de taninos como aditivos alimentarios (Jayanegara *et al.* 2018) y de plantas como fuentes de taninos

(Roca-Fernández *et al.* 2020) se reportaron efectos sobre la desaparición de la FDA, coincidiendo con estos reportes, en este estudio se registró una reducción en la desaparición de la FDA en la dieta BF, aunque no en la dieta AF. La inclusión de OU a la dieta redujo la desaparición de la proteína cruda independientemente del nivel de forraje de la dieta, resultados que coinciden con los de Juráček *et al.* (2021) y Vinyard *et al.* (2021).

Se han propuesto múltiples causas para los efectos deletéreos del OU sobre la digestibilidad de los nutrientes, la producción de gas y de CH_4, principalmente sus altos contenidos de TC, lignina y EE (Hixson *et al.* 2018; Moate *et al.* 2020). Los TC disminuyen la digestibilidad de nutrientes por formación de complejos con proteínas, carbohidratos estructurales y otros polímeros impidiendo su fermentación; además, inhiben de manera directa a los microorganismos y las enzimas microbianas fibrolíticas (Vasta et al, 2019). La lignina no es fermentada en el rumen, induciendo una reducción en la digestión de la fibra por inhibición de las bacterias celulolíticas del rumen, y restricción del acceso de las enzimas fibrolíticas a la celulosa y la hemicelulosa (Moore y Jung, 2001). Los lípidos tienen efectos negativos en la fermentación ruminal y en la digestión de la fibra (Jenkins, 1993) ya que los ácidos grasos poliinsaturados inhiben el crecimiento de bacterias y protozoos, reduciendo la digestión de la fibra. Los ácidos grasos insaturados C-18 generan toxicidad directa sobre protozoarios y metanógenos (Zhang *et al.* 2008), el aceite de semilla de uva esta constituido entre el 66-75% por C-18:2 (Lutterodt *et al.* 2011), además contiene catequina, epicatequina y procianidina B1 (Maier *et al.* 2009), por

lo tanto, se podría esperar un efecto negativo del OU con altos contenidos de semillas, sobre la fermentación ruminal.

La inclusión de OU en las dietas, indistintamente del nivel de forraje modificó la estructura de las poblaciones microbianas del rumen, pero no perjudicó la diversidad, de acuerdo con los resultados del índice de Shannon, que fue incrementado en las muestras de la fase sólida, pero no en la fase líquida, al final de la incubación para las dos dietas evaluadas. Estos resultados coinciden con los de Mateos *et al.* (2017) para fermentaciones en Rusitec. La sustitución de heno mixto por OU en la dieta AF, redujo las poblaciones de *F. succinogenes*, una de las principales bacterias celulolíticas del rumen, sin embargo esto no afectó la desaparición *in vitro* de la FDN o de la MS, lo que podría ser resultado del incremento en las poblaciones de *R. albus* y de *B. fibrisolvens*, importantes degradadores de celulosa y hemicelulosa, así como de las poblaciones de hongos totales, que a través de la actividad mecánica y enzimática aportan a la degradación de la pared celular (Hess *et al.* 2020). La comunidad fibrolítica del rumen muestra redundancia funcional, múltiples microorganismos comparten rasgos funcionales y pueden reemplazarse entre sí (Söllinger *et al.* 2018), esto podría explicar la falta de efectos sobre la desaparición de la fibra y la MS registrados en este ensayo. La DIVMS del OU es significativamente menor (30%, Molina-Alcaide *et al.* 2008) que la del ensilaje de maíz, que esta en el rango 60-70% (Ferreira y Mertens, 2005), lo cual podría reflejarse en la DIVMS de la dieta.

Una reducción de la digestibilidad de la celulosa en la dieta BFOU es consistente con la reducción observada de las poblaciones de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens,* que puede ser resultado de los contenidos de ácidos grasos del OU; la suplementación con ácidos grasos C-18 reduce las poblaciones de *F. succinogenes* e incrementa las de *R. albus* y *R. flavefaciens* (Ivan *et al.* 2013). *R. flavefaciens* no fue incrementado en este ensayo, lo cual podría ser efecto de los polifenoles contenidos en el OU. Se ha establecido que *R. flavefaciens* es altamente susceptible a los polifenoles mientras que *R. albus* es estimulado por estos compuestos (Demirtas *et al.* 2021). *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola* son fermentadores de pectina en el rumen (Zhou *et al.* 2015), y el 20% de la pared celular de pieles del OU son sustancias pécticas ácidas (Pinelo *et al.* 2006), esto podría explicar el incremento de *B. fibrisolvens* registrado para ambas dietas. Las poblaciones de Prevotella spp. fueron mayores en las dietas BF que en las dietas AF, coincidiendo con los resultados de Henderson *et al.* (2015). Sin embargo, la inclusión de OU a las dietas no afecto estas poblaciones, contrario a ensayos previos en los cuales las poblaciones de Prevotella se incrementaron por la inclusión de semillas de uva (Wang *et al.* 2021), o redujeron por el uso de taninos de castaño y quebracho (Díaz-Carrasco *et al.* 2017).

La producción diaria de AGV totales no fue afectada por la inclusión de OU en las dietas experimentales, lo que coincide con resultados previos con OU en condiciones *in vitro* (Giller *et al.* 2021) e *in vivo* (Buffa *et al.* 2020a, Moate *et al.* 2020), pero contrario a esos estudios el perfil de AGV no fue notablemente afectado. La sustitución parcial del ensilaje de maíz por OU en la dieta BF pudo generar una reducción de carbohidratos

rápidamente fermentables y el incremento de la fibra, induciendo a una menor producción de propionato. Así mismo, la disminución de las poblaciones de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*, que producen grandes cantidades de succinato, que se convierte en propionato (Wang *et al.* 2020) pudo causar la reducción de propionato. Otros investigadores (Moate *et al.* 2014; Vinyard *et al.* 2021) también han informado de la reducción de las proporciones molares de propionato con inclusiones de OU superiores al 20% de MS en dietas forrajeras. Dada la reducción de las concentraciones de propionato, es posible que la reducción en el rendimiento de CH_4 por efecto del OU registrada en este ensayo no implique la producción de hidrógeno metabólico y sea un efecto directo de los TC y grasa contenidos en el OU sobre las poblaciones de metanógenos.

Las reducciones en el rendimiento de CH_4 registradas en este estudio son consistentes con los resultados de Moate *et al.* (2014) y Moate *et al.* (2020), quienes atribuyeron estas reducciones a los ácidos grasos y TC contenidos en el OU, los cuales impiden la fermentación y la consecuente formación de CH_4. Se ha reportado un efecto débil de los TC del OU sobre la metanogénesis (Russo *et al.* 2017, Hixson *et al.* 2018), sugiriendo que la reducción de la metanogénesis ruminal por el OU es resultado de la sumatoria de los efectos de lignina, grasa y TC. Los ácidos grasos presentes en el OU podrían tener efectos tóxicos sobre los microorganismos, y generar efectos aditivos con los TC sobre la metanogénesis (Williams *et al.* 2020). Un efecto adverso sobre la fermentación de la fibra y, en consecuencia, una reducción de la producción de CH_4 podría ser el mecanismo que explicaría en parte los resultados para la dieta baja en forraje con inclusión de OU, pero no para la dieta alta en forraje. Las reducciones en las poblaciones

totales de metanógenos como resultado de la inclusión de OU, coinciden con resultados de Zhang *et al.* (2022) que evaluaron OU al 5% MS en ensilaje de alfalfa *in vitro*. La falta de efectos sobre la fibra y la desaparición de la materia seca *in vitro* para la dieta AF confirman que la reducción en la producción de CH_4 es resultado de un efecto deletéreo directo de los TC y la grasa del OU sobre los microorganismos involucrados en la metanogénesis.

Los efectos de los taninos dietarios sobre la proteólisis ruminal y el metabolismo del N, han sido evaluados, aunque los resultados no son consistentes. Sin embargo, el uso de plantas y extractos ricos en taninos se ha propuesto como estrategia para incrementar la retención de N y reducción de las emisiones (Tan *et al.* 2021). Las reducciones en la producción de N-NH_3 registradas para las dos dietas evaluadas son similares a las reportadas por Moate *et al.* (2020), Tayengwa *et al.* (2021) y Ream *et al.* (2021), quienes atribuyeron esta reducción a una disminución de la degradación proteica ruminal, resultado de la formación de complejos tanino-proteína y por la supresión del crecimiento y actividad de las bacterias proteolíticas por parte de los taninos (Vasta *et al.*, 2019). *Butyrivibrio fibrisolvens* y Prevotella Spp. bacterias ruminales con actividad proteolítica (Sales *et al.* 2000), no fueron afectadas por la inclusión de OU, de hecho, las poblaciones de *B. fibrisolvens* se incrementaron en este estudio. La reducción de la producción de N-NH_3, la desaparición *in vitro* de la PC y la reducción de los AGV de cadena ramificada en este ensayo son consistentes con una proteólisis reducida, lo que sugiere la formación de complejos tanino-proteína como causa de estos resultados, en lugar de efectos sobre la actividad microbiana.

Conclusión

El OU País puede ser incluido al 20% MS en una dieta alta en forraje para rumiantes sustituyendo parcialmente al heno mixto sin comprometer la digestión de nutrientes y la fermentación ruminal, sin embargo, la sustitución total del ensilaje de maíz en dietas BF puede reducir la DIVMS y la desaparición de fibra. La reducción en la concentración ruminal de N-NH_3 y el rendimiento de CH_4 (g/kg de MS desaparecida) para las dietas alta y baja en forraje sugieren una reducción en la degradación ruminal de la proteína y de las emisiones entéricas de CH_4, lo que podría estar asociado a una mayor eficiencia en el uso de la proteína y la energía consumida por los animales, reduciendo además impactos ambientales de la ganadería. Los efectos del OU País sobre el rendimiento de CH_4 pueden atribuirse a una acción aditiva de los ácidos grasos y de los taninos condensados, aunque la magnitud de los efectos depende del tipo de fuente fibrosa a la que sustituye el OU.

CAPITULO 4

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN EXTRACTO POLIFENOLICO DE ORUJO DE UVA PAIS SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO

4.1 EFECTOS DE DOSIS CRECIENTES DE UN EXTRACTO POLIFENOLICO DE ORUJO DE UVA PAÍS SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL, PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIONES MICROBIANAS EN UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN RUMINAL RUSITEC

4.1.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de dosis crecientes de un extracto polifenólico de OU País (EOU) sobre los parámetros de fermentación, digestibilidad de nutrientes, producción de metano y principales microorganismos ruminales en un sistema de fermentación semicontínuo Rusitec. Se utilizó como sustrato una dieta alta en forraje, con la inclusión de dosis crecientes del EOU (0, 0.7, 1.4 y 2.1% MS). La inclusión de EOU a la dieta no afectó la DIVMS, la producción de gas, la producción total de AGV, o la producción de ácido acético, pero incrementó linealmente la desaparición *in vitro* de FDN (p=0.006), redujo linealmente la desaparición *in vitro* de la PC (p<0.001), la producción diaria de N-NH_3 (p=0.009) y la proporción molar de AGV de cadena ramificada (p=0.003). La inclusión de EOU redujo la producción de CH_4 por materia seca incubada (p<0.001) y la producción de CH_4 por materia seca desaparecida (p<0.001), hasta un 30% proporcionalmente a la concentración de EOU en la dieta. Los efectos sobre la producción de N-NH_3, se relacionaron con la formación de complejos tanino-proteína,

así como cambios en las poblaciones de bacterias con actividad proteolítica por efecto del EOU. Los efectos sobre el rendimiento de CH_4 se relacionaron con la reducción en la disponibilidad de H_2 por incremento de la producción de propionato y reducción de butirato, y por efecto directo sobre las poblaciones de metanógenos totales. La inclusión de EOU hasta 2.1% MS en dietas altas en forraje reduce la producción y el rendimiento de CH_4, la degradación de la proteína y la producción diaria de N-NH_3 sin afectar la DIVMS, efectos que podrían traducirse en una mayor eficiencia de uso de los nutrientes y menores impactos ambientales de la producción ganadera.

Palabras clave: polifenoles, metabolismo ruminal, amonio, arqueas metanogénicas

4.1.2 Introducción

Los retos actuales de la producción ganadera involucran la búsqueda de estrategias para reducir los aportes a las emisiones de gases de efecto invernadero, la optimización de la eficiencia en términos de salud y producción animal y la generación de alimentos de alta calidad para los animales (Sinz *et al.*, 2019a). En este sentido, la investigación se ha orientado a identificar ingredientes, suplementos y/o aditivos que inhiban directamente los metanógenos o alteren las vías metabólicas hacia la reducción en la producción de sustratos para la metanogénesis. Entre las estrategias más prometedoras en función de la reducción de emisiones de metano entérico, la investigación en torno a lípidos, aceites esenciales, compuestos bioactivos como saponinas, polifenoles y taninos se ha incrementado sustancialmente en los últimos años (Haque, 2018). Los polifenoles y taninos son promisorios, no solo por la reducción de emisiones de CH_4 (Cieslak *et al.*, 2013), también porque se han probado efectos benéficos en la nutrición de rumiantes, como- el incremento del by-pass ruminal de la proteina dietaria (Lavrenčič y Levart, 2021) y efectos positivos sobre la salud animal, especialmente vía propiedades antioxidantes (Bjorklund y Chirumbolo, 2017), que combaten el estrés oxidativo (Soldado *et al.*, 2021). Los polifenoles generan también efectos benéficos sobre la calidad y la seguridad de los productos cárnicos y lácteos, la modulación de la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados y el incremento de los contenidos de ácido linoleico conjugado, vaccénico y ácidos grasos poliinsaturados en leche y carne (Serra *et al.* 2021).

Múltiples fuentes de polifenoles han sido evaluadas en nutrición de rumiantes, especialmente taninos condensados (TC) incluyendo quebracho, mimosa, acacia, papaya, pino, entre otros; con resultados ampliamente variables en función de la dosis, estructura de los taninos, especie animal, dieta utilizada y métodos de evaluación (Tedeschi *et al.*, 2020). En el caso de los subproductos del proceso de vinificación, extractos de semillas de uva (ESU) han sido ampliamente investigados por su potencial en la industria farmacéutica, aunque su uso en alimentación de rumiantes es limitado, y las escasas investigaciones realizadas han arrojando resultados contradictorios, y dependientes de la dosis y dieta evaluadas (Witzig *et al.* 2018, Huang et al, 2018, Sinz *et al.* 2019b, 2021). Aunque el orujo de uva posee compuestos bioactivos como ácido galico, catequina, epigalocatequina y resveratrol, son escasos los estudios sobre extractos de OU en la alimentación de rumiantes. Alipour y Rouzbehan (2010), informaron ralentización de la degradación de proteína y reducción de la IVDMD por efecto del uso de taninos de OU en condiciones *in vitro* e *in sacco*, Gessner *et al.* (2015) demostraron que la suplementación con EOU al 1% MS incrementó la producción láctea, atribuyendo este incremento a la alteración del metabolismo ruminal, y Foiklang *et al.* (2016) demostraron que el polvo de OU al 2% MS en dietas concentradas mejora la digestibilidad, la sínstesis de proteina microbiana y la eficiencia en la fermentación ruminal. Una vez demostrado que el OU País reduce las emisiones de CH_4 y de nitrógeno amoniacal, dados los contenidos de TC del OU País (98.8 mg CAT/g MS) y la presencia de ácido gálico, flavonoles (quercetina, naringina y kaempferol), y flavanoles (catequina y epicatequina) (experimento 2.2 de esta tesis), este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de

dosis crecientes de un extracto polifenólico de OU País sobre los parámetros de fermentación, digestibilidad de nutrientes, producción de metano y principales microorganismos ruminales en un sistema de fermentación semicontínuo Rusitec.

4.1.3 Materiales y métodos

Un extracto polifenólico de OU País (CPT 278.9 mg GAE/g MS y PA 98.8 mg CAT/g MS), sólido, obtenido mediante extracción asistida con microondas, usando una solución hidroetanólica al 80%, 100 segundos de tiempo de aplicación y una potencia de 800 W fue usado en este ensayo.

Diseño experimental, inóculo ruminal y tratamientos

Un experimento con un diseño de bloques completos al azar fue realizado usando un equipo de fermentación semicontinuo (Rusitec) de 8 fermentadores. El estudio constó de dos corridas experimentales de 16 días cada una, con 10 días de adaptación y 6 días de muestreo. Cada tratamiento fue asignado al azar a dos fermentadores en cada corrida. Se formuló una dieta alta en forraje (relación forraje-concentrado 70:30), la cual fue usada como control, y a la cual se incluyó extracto de OU País en dosis crecientes (0%, 0.7%, 1.4%, 2.1% MS), constituyendo cuatro tratamientos. Los ingredientes fueron molidos a 4 mm (molino de corte, Breuer, Temuco, Chile), mezclados y 10 gramos de cada tratamiento fueron depositados en bolsas de poliéster (poro 50 μm; Ankom technology corp.,

Macedon, EE.UU.) previamente pesadas y marcadas. Los ingredientes y la composición química de las dietas experimentales se presentan en la Tabla 4.1.1.

Tabla 4.1.1. Ingredientes y composición química (g/kg MS si no se especifica algo distinto) de las dietas experimentales incubadas en fermentadores Rusitec

Item	**Extracto de OU País (% MS)**			
	0	**0.7**	**1.4**	**2.1**
Ingrediente				
Heno de alfalfa	500	500	500	500
Ensilaje de Maíz	200	200	200	200
Maíz grano húmedo	150	150	142	140
Avena	100	93	94	89
Harina de soya	40	40	40	40
Minerales	10	10	10	10
Extracto de OU País	0	7	14	21
Composición química				
Materia seca, g/kg materia fresca	937.3	937.5	938.3	939.1
Materia orgánica	915.1	916.6	916.9	917.6
Proteína cruda	156.5	155.9	155.8	156.1
Extracto etéreo	20.2	20.2	20.3	20.3
Fibra detergente neutro	408.8	404.9	407.8	408.4
Fibra detergente ácido	295.1	307.8	305.7	298.8
Carbohidratos no fibrosos	332	333.2	331.7	331.9
Taninos condensados	-	6.9	13.8	20.7

La descripción de los animales donadores y su manejo fueron descritas en el estudio 3.1. Previo a este estudio, los animales fueron alimentados por dos semanas con heno de alfalfa y concentrado. Los métodos de colección y procesamiento del fluido ruminal fueron descritos en el estudio 3.1. Muestras de digesta solida de distintas partes del rumen fueron colectadas, transportadas y procesadas en iguales condiciones que el fluido ruminal.

Incubación en el sistema Rusitec

El día 1 de la incubación, cada fermentador fue llenado con 800 mL de fluido ruminal y 200 mL de solución buffer (McDougall, 1948). Adicionalmente, cada fermentador recibió una bolsa de poliéster con 40 g de digesta sólida y otra con 10 g del tratamiento correspondiente. Luego de 24 h de incubación, las bolsas de digesta fueron retiradas y sustituidas por bolsas con el tratamiento correspondiente. Cada fermentador fue infundido de forma permanente con solución buffer (a una tasa de 2.9%/h) durante todo el periodo experimental. El gas producido se recogió en bolsas de colección de orina de 2 L de capacidad, y los efluentes líquidos de cada fermentador fueron recogidos en un matraz Erlenmeyer. La desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue determinada durante los días 11 y 15 de incubación. Una vez las bolsas completaron 48 h de incubación, fueron retiradas del fermentador, lavadas con agua desionizada y secadas en horno a 55°C durante 48 h. La DIVMS fue calculada por diferencia de peso y los residuos agrupados por fermentador para su posterior análisis químico. El volumen de efluentes y la producción de gas (PG) de cada fermentador se midieron diariamente durante el intercambio de bolsas. Esta última a través de un aparato de desplazamiento de agua (Fedorah y Hrudey, 1983). Antes de la medición, se tomó una muestra de gas (15 mL), que se depositó a un exetainer de 5.9 mL (Labco Ltd., High Wycombe, Reino Unido), para determinación de CH_4. Se registró el pH del líquido ruminal el día 1 de la incubación, y del medio de fermentación diariamente con un medidor de pH portátil (Thermo

Scientific, Orion Star A121 pH Portable Meter, USA). Muestras de .5 mL del efluente de cada fermentador fueron colectadas diariamente para determinación de las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) y de nitrógeno amoniacal ($N\text{-}NH_3$), las cuales fueron depositadas en criotubos preparados previamente con ácido metafosfórico al 25% (v/v, 300 µL) para determinación de las concentraciones de AGV y con ácido tricloroacético (0.65 p/v, 150 µL) para determinación de la concentración de $N\text{-}NH_3$. Las muestras fueron conservadas a -20ºC hasta su procesamiento. Para investigar el efecto del nivel de extracto sobre la comunidad microbiana, se tomaron muestras del líquido de los fermentadores (10 mL) y de las bolsas con sustrato los días 5, 10 y 16 de incubación, las cuales fueron congeladas inmediatamente y mantenidas a -80◦C hasta la extracción del ADN.

Extracción de ADN y ensayo qPCR

Los procesos de extracción de ADN y el ensayo PCR cuantitativo realizados en este estudio, así como las secuencias de oligonucleótidos usados mantienen la metodología descrita en detalle en el experimento 3.2 de esta tesis. El análisis de la expresión génica relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, Prevotella spp., y metanógenos totales se determinó con el método 2-ΔΔCt, usando bacterias totales como estándar interno, donde Ct es el ciclo umbral corregidas las diferencias en las eficiencias de amplificación entre el objetivo y las bacterias totales.

Análisis químico

Muestras de los tratamientos y de los residuos de la fermentación fueron molidos (molino de grano, Breuer, Temuco, Chile) a través de un tamiz de 1 mm para su análisis de acuerdo con los análisis descritos en el punto 2.1 de esta tesis. Las concentraciones de AGV y la producción de N-NH_3 (mmol/L) obtenidos fueron multiplicados por el volumen de efluente (L/día) para estimar la producción diaria de AGV y N-NH_3, expresadas en mmol/día.

Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados para los supuestos de normalidad y homocedasticidad, con los test de Shapiro-Wilk y Levene. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas a los datos de parámetros de la fermentación ruminal, PG y CH_4, por los días de muestreo y fermentadores, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde: "Y"$_{ij}$ es cada observación de la unidad experimental, μ es la media general; α_i es la concentración del extracto de OU País (efecto fijo); β_j es la incubación (efecto aleátorio); y ε_{ij} es el error experimental. Los resultados se presentan como media ± el error estándar de la media. Se realizaron contrastes polinómicos lineales y cuadráticos para examinar las respuestas a la dosis de extracto de OU País, declarando diferencias estadísticas cuando $p<0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando Stata Ver. 15.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

Los datos del análisis molecular se transformaron a porcentaje como (2-ΔCT) × 100 y luego a escala log 10 antes del análisis estadístico. Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas fue, realizado, incluyendo los efectos fijos del nivel de extracto, el día y la interacción extracto × día. No se incluyó el efecto de bloques en este estudio. Se realizaron contrastes polinómicos lineales y cuadráticos para examinar los efectos del nivel de inclusión de EOU sobre las poblaciones microbianas. Se declararon diferencias estadísticas cuando $p<0.05$. Las medias se compararon mediante el test de Tukey y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para establecer el grado de asociación entre los parámetros de la fermentación, el rendimiento de CH_4, el N-NH_3 y las poblaciones microbianas.

4.1.4 Resultados

Desaparición de nutrientes y parámetros de la fermentación ruminal

La inclusión de EOU a la dieta no afectó la DIVMS, la desaparición verdadera de la materia seca, la producción total de AGV, o las proporciones molares de ácido acético (Tabla 4.1.3). El incremento en la concentración de EOU en la dieta incrementó linealmente la desaparición *in vitro* de FDN ($p=0.006$), de FDA ($p<0.001$), pero generó una reducción lineal en la desaparición *in vitro* de la PC ($p<0.001$), la producción diaria de N-NH_3 ($p=0.009$), la proporción molar de AGV de cadena ramificada ($p=0.003$), la proporción molar de ácido butírico ($p=0.002$) y la relación A:P ($p=0.001$). La proporción

molar de propionato se incrementó linealmente (p=0.001) con el incremento de EOU en la dieta. La inclusión del 2.1% (MS) de extracto a la dieta generó reducciones del 24% en la desaparición *in vitro* de la proteína cruda, del 30% en la producción diaria de N-NH_3, y del 32% en la concentración de ácidos grasos volátiles de cadena ramificada, entre tanto, la inclusión del 1.4% MS de EOU redujo en 12% la desaparición *in vitro* de la PC, en 24% la producción diaria de N-NH_3, y en 19% la concentración de ácidos grasos volátiles de cadena ramificada.

Tabla 4.1.3. Efectos de la concentración de extracto de orujo de uva País (EOU) sobre la desaparición de nutrientes y parámetros de fermentación de una dieta alta en forraje en fermentadores Rusitec

Item	**EOU (% MS)**				**EEM**	***p*-valor**	**Contrastes**	
	0.0	**0.7**	**1.4**	**2.1**			**L**	**Q**
Desaparición *in vitro* de nutrientes								
Materia seca	59.0	58.7	58.8	59.3	0.690	0.193	0.173	0.376
[1]DVMS	76.4	76.8	77.2	77.6	0.375	0.064	0.058	0.284
FDN	41.7	42.9	44.3	45.4	0.909	0.005	0.006	0.019
FDA	19.2	25.4	24.3	23.8	1.191	<0.001	<0.001	<0.001
PC	74.7	70.2	66.1	57.1	0.297	<0.001	<0.001	0.958
Parámetros de la fermentación ruminal								
pH	5.9	5.9	5.9	5.9	0.691	0.912	0.612	0.076
N-NH_3, mmol/Día	9.4	7.7	7.4	6.6	1.020	0.029	0.009	0.486
AGV, mmol/d	34.0	33.3	33.1	32.6	1.872	0.630	0.590	0.970
AGV, mmol/100 mmol								
Acetato	47.5	48.7	47.3	47.5	0.871	0.594	0.994	0.712
Propionato	29.9	31.2	31.7	32.2	0.501	0.023	0.001	0.394
Butirato	13.1	12.4	12.0	10.7	0.553	0.012	0.002	0.569
AGVCR	2.14	1.95	1.73	1.46	0.121	0.007	0.003	0.162
Relación A:P	1.62	1.63	1.50	1.41	0.054	0.001	0.001	0.001

Nota, EEM: error estándar de la media, L: lineal, Q: cuadrático, DVMS: desaparición verdadera de la materia seca, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, PC: proteína cruda, AGV: ácidos grasos volátiles, AGVRC: AGV de cadena ramificada (iso-valerato + iso-butirato).

Producción de gas y metano

La inclusión de EOU en la dieta no afectó la producción de total de gas (mL), la producción de gas por materia seca incubada (mL/g MSi), ni la producción de gas por materia seca desaparecida (mL/g MSd) (Tabla 4.1.4). Sin embargo, la producción de CH_4 (mg) (p<0.001), la producción de CH_4 por materia seca incubada (mg/gMSi) y la producción de CH_4 por materia seca desaparecida (mg/gMSd) disminuyeron linealmente con el incremento de la concentración de EOU en la dieta.

Tabla 4.1.4. Efectos de la concentración de extracto de orujo de uva País (EOU) sobre la producción de gas y metano (CH_4) de una dieta alta en forraje en fermentadores Rusitec.

Ítem	**EOU (% MS)**				**EEM**	***p*-valor**	**Contrastes**	
	0.0	**0.7**	**1.4**	**2.1**			**L**	**Q**
Gas total (mL)	1537	1510	1509	1505	26.2	0.796	0.652	0.396
mL/g MSi	165.6	163.1	161.7	160.4	3.38	0.731	0.266	0.867
mL/g MSd	285.1	280.5	281.8	269.3	6.64	0.637	0.125	0.555
CH_4 total (mg)	72.0	64.2	58.1	51.4	2.47	< 0.001	<0.001	< 0.001
mg/g MSi	7.72	6.90	6.22	5.51	0.265	< 0.001	< 0.001	0.841
mg/g MSd	13.3	11.9	10.9	9.3	0.471	< 0.001	< 0.001	0.830

Nota, EEM: error estándar de la media, L: lineal, Q: cuadrático, MSi: materia seca incubada, MSd: materia seca desaparecida.

La producción de CH_4 (mg), la producción por materia seca incubada y el rendimiento de CH_4 (mg/g MSd) mostraron reducciones de igual magnitud en cada dosis de EOU, con reducciones del 11% para la concentración de 0.7%, del 19% para la

concentración de 1.4% y del 29% para la concentración de 2.1%. La inclusión de EOU al 2.1% resultó en una reducción de CH_4 del 14% por g EOU incluido en la dieta.

Efectos del extracto de OU País sobre las poblaciones microbianas

El extracto de OU País no afectó las poblaciones de bacterias totales en las muestras asociadas a la fase sólida, ni en las muestras correspondientes a la fase líquida (Tabla 4.1.5). Las poblaciones de hongos en las muestras SAM fueron afectadas por el EOU (p=0.003), aunque no en las muestras LAM. EL EOU País al 1.4 y al 2.1% MS incrementó las poblaciones de hongos al final de la incubación (día 16), comparado con el control. No hubo efectos del EOU al 0.7% MS. La diversidad de las poblaciones microbianas de los fermentadores, expresada por el índice de Shannon, no fue afectada por la inclusión de EOU País a la dieta.

Tabla 4.1.5. Efectos de un extracto de orujo de uva País (EOU) sobre las poblaciones de bacterias y hongos totales (log_{10} concentración de ADN (ng/g MS)) en muestras sólidas (SAM) y líquidas (LAM) de fermentadores Rusitec

		SAM			LAM		
Día	**EOU (%)**	**Bacterias totales**	**Hongos totales**	**Índice de Shannon**	**Bacterias totales**	**Hongos totales**	**Índice de Shannon**
5	**0.0**	15.3	0.08^{BC}	3.1	2.1	1.5	2.6
	0.7	15.1	0.06^{C}	2.6	2.1	0.2	2.7
	1.4	15.2	0.07^{BC}	2.6	2.2	0.3	2.8
	2.1	15.4	0.08^{BC}	2.8	2.3	0.5	2.6
10	**0.0**	16.2	0.1^{B}	3.1	3.7	0.6	2.6
	0.7	15.8	0.2^{AB}	2.7	3.2	0.4	3.1
	1.4	16.0	0.3^{AB}	2.9	3.4	0.5	3.2

	2.1	16.1	0.3^{AB}	3.2	3.5	0.4	3.2
16	**0.0**	15.5	0.1^{B}	3.1	2.9	0.4	2.6
	0.7	15.7	0.3^{AB}	2.9	2.9	0.3	2.9
	1.4	15.8	0.4^{A}	3.3	3.0	0.2	3.0
	2.1	16.0	0.4^{A}	3.6	3.3	0.2	3.1
EEM		0.335	0.008	0.126	0.558	0.443	0.333
***p*-valor**	**EOU**	0.959	0.030	0.026	0.935	0.661	0.421
	Día	0.017	0.046	0.054	0.402	0.091	0.601
	EOU × D	0.996	0.390	0.932	0.937	0.134	0.254

Nota: EEM: error estándar de la media, EOU: extracto de orujo de uva, E × D= interacción ente concentración de extracto y el día.

La abundancia relativa de las principales poblaciones microbianas fue afectada por la inclusión del EOU, por el día de muestreo, y por la interacción entre estas dos variables (Tabla 4.1.6). La interacción entre el nivel de inclusión de EOU y el día de muestreo redujo las poblaciones de metanógenos totales en las muestras SAM (p=0.001) y en las muestras LAM (p=0.001), e incrementó las poblaciones de *R. albus* (p=0.001) en las muestras SAM, proporcionalmente al nivel de EOU en la dieta. Por su parte, en las muestras LAM (p=0.001) se registró un comportamiento semejante en los primeros días de incubación, pero una reducción de estas poblaciones fue registrada hacia el final de la incubación. Las poblaciones de *R. flavefaciens* fueron reducidas al inicio de la incubación, pero se incrementaron en los días 10 y 16 de incubación por efecto del EOU (p=0.041) en las muestras SAM. Un efecto contrario se registró para las muestras LAM, en las cuales la interacción ente el EOU y el día de muestreo (p=0.001), incrementó las poblaciones de *R. flavefaciens* al inicio de la incubación (días 5 y 10), pero registraron una reducción al final de la incubación. Un incremento en las poblaciones de *B. fibrisolvens*, en las muestras SAM al inicio de la incubación (día 5) por efecto del EOU (p<0.001) fue

registrado, sin embargo, la inclusión de EOU al 1.4 y 2.1% generó una reducción de estas poblaciones al final de la incubación (p=0.001). Las poblaciones de Prevotella spp. fueron reducidas por efecto del EOU sin importar la dosis, en las muestras SAM (p=0.031) y muestras LAM (p<0.001) en todos los días de muestreo.

Tabla 4.1.6. Efectos de dosis crecientes de un extracto de orujo de uva (EOU) sobre la abundancia relativa (% de bacterias totales) del ADN de metanógenos totales y principales bacterias fibrolíticas en muestras en muestras sólidas (SAM) y líquidas (LAM) de fermentadores Rusitec.

Día	EOU (%)	Metanógenos	*R. albus*	*R. flavefaciens*	*F. succinogenes*	*B. fibrisolvens*	Prevotella spp
SAM							
5	**0.0**	1^{A}	1^{E}	1^{C}	1^{B}	1^{B}	1^{A}
	0.7	0.8^{AB}	1.6^{DE}	0.9^{C}	1.1^{AB}	1.6^{A}	0.9^{A}
	1.4	0.6^{AB}	2.1^{D}	0.7^{CD}	1.4^{AB}	1.4^{AB}	0.8^{AB}
	2.1	0.5^{B}	3.3^{C}	0.6^{D}	1.8^{A}	1.3^{B}	0.7^{AB}
10	**0.0**	1^{A}	1^{E}	1^{C}	1^{B}	1^{B}	1^{A}
	0.7	0.6^{AB}	2.2^{D}	1.2^{BC}	0.6^{BC}	1.1^{AB}	0.5^{B}
	1.4	0.6^{AB}	3.7^{BC}	1.5^{B}	0.5^{BC}	1.0^{AB}	0.3^{BC}
	2.1	0.2^{BC}	4^{B}	1.7^{AB}	0.5^{BC}	0.9^{BC}	0.1^{C}
16	**0.0**	1^{A}	1^{E}	1^{C}	1^{B}	1^{B}	1^{A}
	0.7	0.4^{BC}	3.2^{C}	1.5^{B}	0.6^{BC}	1.1^{AB}	0.2^{BC}
	1.4	0.2^{BC}	4^{B}	1.7^{AB}	0.35^{C}	0.9^{BC}	0.2^{BC}
	2.1	0.1^{C}	4.6^{A}	2.1^{A}	0.11^{D}	0.6^{C}	0.1^{C}
EEM		0.009	0.018	0.036	0.031	0.040	0.085
p-valor	**EOU**	<0.001	<0.001	0.428	<0.001	<0.001	0.051
	Día	<0.001	<0.001	0.041	<0.001	<0.001	<0.001
	EOU×D	0.001	0.001	0.045	0.001	0.001	0.031
LAM							
5	**0.0**	1^{A}	1^{B}	1^{B}	1^{B}	1^{B}	1
	0.7	0.04^{B}	1^{B}	1.5^{A}	1.3^{A}	1.9^{A}	0 .9
	1.4	0.03^{BC}	1.5^{AB}	1.5^{A}	1^{B}	1.1^{B}	0 .8
	2.1	0.01^{C}	1.6^{AB}	1.4^{A}	0.9^{B}	0.9^{BC}	0 .7

10	**0.0**	1^{A}	1^{B}	1^{B}	1^{A}	1^{B}	1
	0.7	0.04^{B}	1.6^{AB}	1.2^{AB}	0.8^{BC}	0.9^{BC}	0 .8
	1.4	0.03^{BC}	1.6^{AB}	1.2^{AB}	0.7^{BC}	0.8^{BC}	0 .7
	2.1	0.01^{C}	1.8^{A}	1.6^{A}	0.6^{C}	0.7^{C}	0 .5
16	**0.0**	1^{A}	1^{B}	1^{B}	1^{A}	1^{B}	1
	0.7	0.02^{BC}	0.5^{C}	0.5^{C}	0.7^{BC}	0.8^{BC}	0 .8
	1.4	0.01^{C}	0.2^{CD}	0.4^{C}	0.5^{CD}	0.5^{CD}	0 .7
	2.1	0.01^{C}	0.1^{D}	0.1^{D}	0.3^{D}	0.3^{D}	0 .5
EEM		0.041	0.179	0.064	0.035	0.043	0.061
	EOU	<0.001	0.011	0.508	<0.001	<0.001	<0.001
p-valor	**Día**	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003
	EOU×D	0.001	0.001	0.001	<0.001	0.001	0.189

Nota: EEM= error estándar de la media, EOU × D= interacción del nivel de extracto de orujo de uva por el dia de muestreo

Las asociaciones entre los principales parámetros de fermentación ruminal, producción de CH_4, desaparición de nutrientes, los contenidos de taninos condensados y las concentraciones de ADN (ng/g MS) de las poblaciones de bacterias totales y hongos totales fueron determinadas por correlación de Pearson (Figura 4.1.1). Se registró una estrecha relación entre los contenidos de TC de la dieta con la producción de propionato (r=0.996, *p*=0.004), la producción diaria de N-NH_3 (r= -0.957, *p*=0.003), las proporciones molares de AGVCR (r=-0.997, *p*=0003), rendimiento de CH_4 (r=-0.996, *p*=0.004), las poblaciones de bacterias totales solo fueron asociadas a la producción de gas (mL/g MSd) (r=-0.954, *p*=0.046); mientras que las poblaciones de hongos totales fueron asociadas a la desaparición *in vitro* de la FDN (r=0.991, *p*=0.009), la proporción molar de propionato (r=0.995, *p*=0.005) y la producción de N-NH_3 (r=0.989, *p*=0.011).

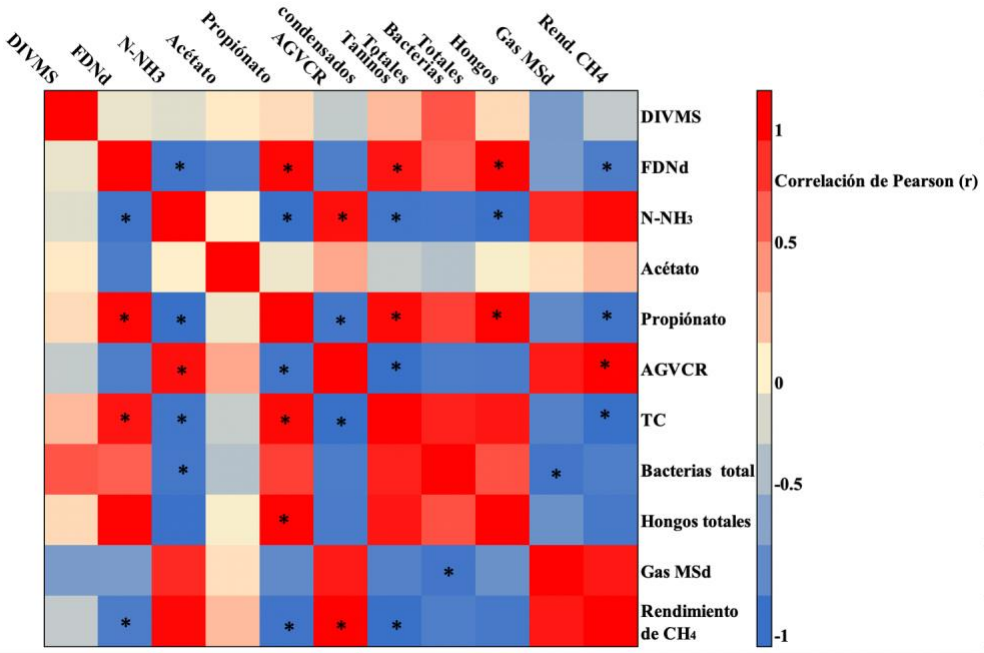


Figura 4.1.1 Heatmap de la asociación entre parámetros de fermentación ruminal, rendimiento de CH_4, los contenidos de taninos condensados de la dieta y las concentraciones de ADN (ng/g MS) de las poblaciones de bacterias totales y hongos totales, con base en la puntuación del coeficiente de correlación de Pearson (r). Correlaciones estadísticamente significantes ($p<0.05$) son indicadas con un *.

4.1.5 Discusión

Los efectos de la suplementación con polifenoles sobre la digestibilidad de nutrientes y parámetros de fermentación dependen del tipo y dosis usados (Min y Solaiman, 2018). Se han reportado reducciones de la DIVMS y de la materia orgánica en fermentaciones *in vitro* de forrajes por la adición del 5% (MS) de taninos condensados (Bueno *et al.* 2020). Sin embargo, la DIVMS de dietas forrajeras no fue afectada por la adición de diferentes concentraciones de taninos purificados (hasta 4.12% del sustrato) en fermentaciones *in vitro* (Bharathidhasan, 2018). Alipour y Rouzbehan (2010) reportaron los efectos de taninos de OU hasta 60 g/kg MS, sobre la digestibilidad de la harina de soya, demostrando una ralentización de la degradación y reducción de la IVDMD. El uso de extractos de semilla de uva (ESU) ha sido investigado, con resultados variables en función de la dosis usada y tipo de dieta. La adición de ESU al 7.4% MS redujo la digestibilidad aparente de la materia orgánica y de la FDN de una dieta con una relación forraje-concentrado 55:45 para corderos (Sinz *et al.* 2021). Sin embargo, la inclusión de ESU al 1.1% MS a la dieta no afectó la digestibilidad aparente de la materia orgánica, ni de la FDN en corderos alimentados con una dieta alta en proteína (Sinz *et al.* 2019). La suplementación con ESU

al 10% MS redujo la degradación de la materia orgánica, de la FDN, FDA y de la proteína de un ensilaje en fermentadores Rusitec (Witzig *et al.* 2018). En este ensayo la concentración máxima de EOU fue de 2.1% (MS), es posible que las bajas concentraciones usadas sean la causa de la falta de efectos en la DIVMS y la DVMS, así como en la producción total de AGV y en las proporciones molares de ácido acético. Además, contrastando con los resultados de Witzig *et al.* (2018) la inclusión de EOU País incrementó la desaparición *in vitro* de FDN y FDA, resultados que coinciden con los de Piñeiro-Vásquez *et al.* (2017) quienes evaluaron dosis crecientes de TC de quebracho hasta del 3% MS, sobre la digestibilidad de forrajes de calidad media. La desaparición *in vitro* de la PC se redujo en proporción a la concentración de EOU País en la dieta, alcanzando una reducción del 24% con la inclusión del EOU al 2.1%, porcentajes superiores a los de Wischer *et al.* (2013) quienes reportaron reducciones del 8% en la desaparición *in vitro* de la PC de forrajes en Rusitec por la inclusión de un extracto de semilla de uva al 10% MS; y contrarios a los de Sinz *et al.* (2019 b), quienes reportaron que la adición de un ESU al 2% MS a una dieta alta en proteína no afectó la digestibilidad de la CP. Taninos condensados de *Acacia mearnsii* al 2% MS redujeron la digestibilidad de la PC en 9% de una dieta alta en forraje (Avila *et al.* 2020), sin embargo, un extracto de *Acacia mearnsii* hasta el 1.5% de la MS generó reducciones del 18% en la digestibilidad de la PC en una ración totalmente mezclada con una relación forraje-concentrado 50:50 en vacas lecheras (Perna-Junior *et al.*, 2020). Contrario a la reducción de las poblaciones de *F. succinogenes*, una de las principales bacterias celulolíticas del rumen, las poblaciones de *R. albus*, de *R. flavefaciens* y de hongos se incrementaron por

efecto del EOU País. Estos resultados coinciden con los de Zhang *et al.* (2020), quienes reportaron reducciones del 50% en las poblaciones de *F. succinogenes* e incrementos en las poblaciones de hongos anaeróbicos por efecto de un extracto de semillas de uva al 0.2% MS en condiciones *in vitro*. Sin embargo, en este ensayo la DIVMS y la producción de gas no fueron afectadas. Las inconsistencias en los resultados podrían ser resultado de las diferencias en los polifenoles contenidos en los extractos de semilla de uva y en los extractos de OU. En las semillas de uva abundan ácido gálico, catequina, epicatequina y proantocianidinas, mientras que el OU (por su contenido de pieles) contiene menos procianidinas (con excepción del dímero B1 de procianidina), pero cantidades significativas de antocianinas, como el 3-glucósido de cianidina, el 3-glucósido de malividina, la cianidina y la peonidina, que están ausentes en las semillas (Gessner *et al.* 2012). Aunque son escasos los estudios sobre los efectos de antocianos sobre microorganismos ruminales, Yusuf *et al.* (2021) reportaron una reducción en las poblaciones del género Prevotella, y un cambio general en la estructura de la microbiota ruminal por efecto de antocianidinas de maíz morado en condiciones *in vivo*. Aunque no se determinó el contenido de antocianidinas del extracto, el OU País usado para obtener el extracto contenía 3.52 mg de antocioanidinas/g MS, 1.02 μ mol/g de malvidina 3-O-hexósido y 0.4 μ mol/g de peonidina 3-O-hexósido. Es posible que estas antocianidinas se hayan transferido al extracto y sean responsables de los incrementos en las poblaciones de *R. albus* y *R. flavefaciens* y los efectos sobre la desaparición de FDN, pero esta hipótesis debe ser verificada.

La reducción en la *desaparición in vitro* de la PC registrada en este ensayo parece ser el resultado de las reducciones en las poblaciones de Prevotella spp. por efecto directo de los TC, bacterias altamente susceptibles a los TC (Saminathan *et al.* 2015). Estos resultados coinciden con los de Chen *et al.* (2021) para fermentaciones *in vitro* de alfalfa con TC. Sin embargo, la reducción en la desaparición de la proteína también podría ser resultado de la formación de complejos tanino-proteína (Waghorn, 2008), capacidad que depende del tamaño de los TC. Una mayor capacidad de agregación de proteínas se ha identificado en TC con grado de polimerización media (mDP) hasta 8 y peso molecular de alrededor de 2000 Da, reduciéndose a medida que el mDP y el peso molecular se incrementan (Ropiak *et al.* 2017). Las proantocianidinas del OU País se caracterizan por un mDP de 9.2 y un peso molecular promedio de 3019 Da, siendo el 59% de las moléculas, de bajo peso molecular (Figueroa *et al.* 2020), por lo cual una alta capacidad de formación de complejos tanino-proteína podría ser esperada para el EOU País.

La inclusión de EOU redujo la producción diaria de N-NH_3 proporcionalmente a la concentración en la dieta, alcanzando reducciones del 30% con EOU al 2.1% MS y del 24% con EOU al 1.4% MS. Estas reducciones son superiores a las de 15% reportadas por Sinz *et al.* (2019) al incluir distintos extractos vegetales ricos en TC al 5% MS en dietas forrajeras; y a los de Wischer *et al.* (2013), quienes reportaron reducciones del 10% en la producción diaria de amonio con extracto de semilla de uva al 10% en incubaciones *in vitro*. Pero coinciden con los de Vera *et al.* (2021) quienes reportaron reducciones de N-NH_3 del 31% en una dieta alta en concentrado con extracto de corteza de pino al 1.5 y 1.8% MS en fermentaciones *in vitro*, y los de Cieslak *et al.* (2016), quienes reportaron

reducciones del 18% y 23% por la adición de 2.5 g/kg de taninos de roble y de arándano rojo a una dieta alta en forraje en fermentadores Rusitec. Las reducciones en la producción diaria de N-NH_3 registradas en este estudio son el resultado de una reducción en la proteólisis, por la formación de complejos tanino-proteína y por efectos sobre las poblaciones de bacterias proteolíticas, lo cual coincide con la reducción en la producción de ácidos grasos de cadena ramificada, que son resultado del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en el rumen (Costa *et al.* 2018). Las altas correlaciones obtenidas entre los taninos contenidos en la dieta, la producción de propionato la producción diaria de N-NH_3 y las proporciones molares de AGCR ratifican estos resultados. La reducción en la desaparición de la proteína, el incremento de la desaparición de FDA y FDA y la falta de efectos sobre la DIVMS pueden ser resultado de una mayor afinidad de los TC del EOU con las proteínas, que, con los polisacáridos, como fue reportado previamente por Huyen *et al.* (2016), y Patra y Saxena (2011).

El EOU no afectó la producción diaria de AGV, ni la proporción molar de acetato, pero incrementó la proporción molar de propionato y redujo la proporción molar de butirato, resultados que coinciden con los de Zhang *et al.* (2020), quienes reportaron incrementos en las concentraciones molares de propionato y reducción del acetato, por efecto de las procianidinas de semilla de uva. Estos autores reportaron al igual que en este estudio, reducciones en las poblaciones de metanógenos y de *F. succinogenes.* Aunque en este estudio las proporciones de acetato no fueron afectadas, las proporciones de butirato fueron reducidas hasta un 18% por el EOU, lo cual pudo reducir la disponibilidad de H_2 para la metanogénesis, junto con el incremento en la producción de propionato, que reduce

la formación de CH_4, por competencia por el H_2 con la síntesis de CH_4 (Cieslak *et al.* 2012). Aunque no se evaluó los efectos del EOU sobre las poblaciones de protozoarios, la reducción en la producción de butirato sugiere un efecto inhibitorio sobre estos, principales productores de butirato en el rumen (Zhang et al 2020), lo cual podría aportar también a la reducción en la producción de CH_4 dada la relación simbiótica entre protozoarios y metanógenos (Dhanasekaran *et al.* 2020). Lima *et al.* (2019), reportaron reducción de las poblaciones de protozoarios sin afectar la digestibilidad de una dieta forrajera en condiciones *in vivo* por la inclusión de taninos condensados al 3% MS.

El EOU País generó una reducción lineal de hasta el 30% en la producción (mg/gMS incubada) y 34% en el rendimiento (mg/gMS desaparecida) de CH_4. En algunos casos la produccion de CH_4 puede ser afectada por una baja disponibilidad de sustratos para la metanogénesis (H_2 y CO_2) y por toxicidad de los metanógenos. Los cambios en las concentraciones de ácido propiónico y ácido butírico registrados en este estudio sugieren alteración de la vía hidrogenotrópica de la metanogénesis por reducción de la disponibilidad de H_2. Así mismo, se ha propuesto que las unidades monoméricas flavan-3-ol como la (+) catequina, precursoras de los taninos, actúan como antirreductores en rumen, captando 6 moles de H_2, por mol de catequina, induciendo una reducción en la producción de CH_4 en una relación de 1.2 moles de CH_4 por mol de (+) catequina (Becker *et al.* 2014), lo cual podría influir en los resultados de este estudio. Por otra parte, los resultados del qPCR indican un efecto del EOU sobre las poblaciones de metanógenos, lo cual coincide con Zhang *et al.* (2020), quienes reportaron reducción de las poblaciones de

arqueas metanogénicas del rumen por efecto de las proantocianidinas de la semilla de uva (0.2% MS). Estos resultados están en línea con los índices de asociación obtenidos entre el rendimiento de CH_4 los contenidos de TC y la producción de propionato. Es posible que la reducción en las emisiones de CH_4 registradas en este estudio sean resultado del efecto aditivo de la reducción en la disponibilidad de H_2, la captación de H_2 por las unidades monoméricas flavan-3-ol presentes en el EOU y la toxicidad sobre los metanógenos.

4.1.6 Conclusión

La inclusión de EOU hasta 2.1% MS en dietas altas en forraje reduce la producción y el rendimiento de CH_4 y la producción diaria de N-NH_3, sin afectar la DIVMS. El análisis de qPCR indicó un efecto directo del EOU País sobre las poblaciones de metanógenos lo cual reduce la producción de CH_4, y no el deterioro de la fermentación ruminal por afectación de las poblaciones fibrolíticas. Así mismo, los efectos del OU País sobre la proteólisis por efectos sobre las poblaciones de Prevotella spp. y la formación de complejos tanino-proteína serían la causa de la reducción en la producción de N-NH_3. Estos efectos podrían traducirse en una mayor eficiencia de uso de los nutrientes por los animales y menores impactos ambientales de la producción ganadera, sin embargo, es necesario evaluar su proyección a condiciones *in vivo* y sus efectos en el largo plazo sobre las poblaciones microbianas.

4.2 EFECTOS DE LA COMBINACION DE UN EXTRACTO POLIFENÓLICO Y ACEITE DE ORUJO DE UVA PAÍS SOBRE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN, PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIONES MICROBIANAS IN VITRO

4.2.1 Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de un extracto polifenólico de orujo de uva (OU) País solo o en combinación con aceite de OU en dosis crecientes (2.5% y 5% MS) a una dieta alta en forraje sobre los parámetros de fermentación, la producción de CH_4 y las poblaciones microbianas, en condiciones *in vitro*. Se realizó un ensayo en un arreglo factorial completamente al azar de 2 × 3 con seis tratamientos: una dieta control (CON), alta en forraje (relación forraje-concentrado 70:30); tratamiento, E: dieta control con inclusión de 21 g/kg de extracto de orujo de uva (EOU). Tratamiento A2.5: dieta control con inclusión de 25 g/kg aceite de OU (AOU). Tratamiento A5: dieta control con 50 g/kg de AOU. Tratamiento EA2.5: dieta control con inclusión de 21 g/kg de EOU y 25 g/kg de AOU. Y tratamiento EA5: dieta control con inclusión de 21 g/kg de EOU y 50 g/kg de AOU. Se realizaron 3 incubaciones de 24 h en semanas consecutivas, las concentraciones de ácidos grasos volátiles y metano se determinaron por cromatografía de gases y los cambios en las poblaciones microbianas por qPCR. La inclusión de aceite de OU redujo la DIVMS (p<0.001), no hubo efectos sobre las concentraciones de AGV

totales, pero el propionato fue incrementado por efecto del extracto de OU (p=0.001) hasta un 18%. El extracto de OU redujo la concentración de N-NH_3 en 29% (p<0.001) y los ácidos grasos de cadena ramificada en 18% (p=0.025). La producción de CH_4 fue reducida en 24% (p=0.041) y el rendimiento de CH_4 en 29% (p=0.042) por efecto de la interacción ente el extracto de OU y el aceite de OU. Las poblaciones de metanógenos fueron reducidas por efecto del EOU (p<0.001), del AOU (p<0.001) y su interacción (p<0.001). Las poblaciones de *Ruminococcus albus* (p=0.022), *Fibrobacter succinogenes* (p=0.004) y Prevotella spp. (p=0.006) fueron afectadas por la interacción entre aceite de OU y extracto de OU. Las poblaciones de *Butyrivibrio fibrisolvens* se incrementaron por efecto del extracto de OU (p=0.006) y por efecto del aceite (p=0.001). Un efecto aditivo de la inclusión de extracto polifenólico y el aceite de orujo de uva redujo las poblaciones de metanógenos totales e incrementó la producción de propionato, lo cual se reflejó en una reducción en la producción y el rendimiento de CH_4. Sin embargo, con base en los resultados el extracto polifenólico de OU País posee un mayor potencial antimetanogénico que el aceite o su combinación; sin afectar la fermentación ruminal, y con una reducción importante de la producción de N-NH_3.

Palabras clave: polifenoles, ácidos grasos de cadena larga, rumiantes, metano, amonio

4.2.2 Introducción

Diferentes estrategias dietarias se han evaluado en función de reducir las emisiones de CH_4, en la búsqueda del incremento en la productividad y sostenibilidad de la producción ganadera. El uso de taninos y grasas de forma individual en dietas de rumiantes ha sido ampliamente investigado (Purba *et al.* 2020; Ibrahim *et al.* 2021). La adición de grasas a la dieta reduce las emisiones de CH_4, e incrementa la densidad energética y la palatabilidad del alimento. Adicionalmente en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de ácidos grasos para modular procesos fisiológicos y manipular el perfil lipídico de los productos derivados de rumiantes (Amanullah *et al.* 2022). Aceites vegetales con altos contenidos de ácidos grasos insaturados reducen la producción de CH_4 porque alteran los procesos de biohidrogenación y tienen efectos tóxicos sobre protozoarios y poblaciones metanogénicas. En general los ensayos con aceites vegetales incluyen el uso de aceite de coco, aceite de girasol, soya, palma y linaza. El aceite de semilla de uva contiene grandes cantidades de acido linoleico (C18:2) el cual tiene el potencial de incrementar el flujo duodenal del ácido linoléico (18:2n-6) y sus productos intermedios de biohidrogenación como el ácido ruménico y el ácido vaccénico entre otros CLA e isómeros trans-18:1 (Chikwanha *et al.* 2018).

Por su parte, los polifenoles y especialmente taninos condensados (TC) tienen la capacidad de interactuar con la microbiota ruminal, afectando la fermentación de la fibra, y el metabolismo proteico y lipídico (Vasta *et al.*, 2019). Se ha reportado que dietas con

altos contenidos de CT inhiben los pasos finales de la biohidrogenación ruminal (Thanh *et al.*, 2022), además de reducir las emisiones de CH_4 de los rumiantes. La actividad y eficacia de los taninos para generar estos efectos depende del tipo y la dosis de TC usada, así como el tipo de dieta a la cual se adiciona (Min *et al.*, 2020; Menci *et al.*, 2021). Diversas fuentes de taninos han sido evaluadas, siendo las más comunes quebracho, acacia y mimosa tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Purba *et al.* 2020). Recientemente se ha incrementado el número de trabajos en los cuales el OU y otros subproductos se han evaluado como suplementos para rumiantes, Corredu *et al.* (2016) reportaron un incremento de los CLA en leche de ovejas por uso combinado de semillas de uva y de linaza, Moate *et al.* (2020) y Vinyard *et al.* (2021) evaluaron los efectos de la inclusión de OU en dietas para vacas lecheras y de ganado de engorda. más recientemente Zhang *et al.* (2020) evaluaron los impactos del uso de un extracto rico en taninos de semilla de uva al 0.2% MS sobre la producción de CH_4 en condiciones *in vitro*. Por otra parte, Thanh *et al.* (2022) evaluaron dosis crecientes de un extracto rico en taninos de semilla de uva en dosis crecientes solo o en combinación con aceite de soya al 2.5% MS sobre la fermentación y biohidrogenación ruminal, y la producción de CH_4, encontrando un mayor efecto de los ácidos grasos sobre la modulación de la biohidrogenación y la producción de CH_4, cuando estos se adicionaban solos o con una concentración muy baja de extracto. A nuestro entendimiento no existen estudios que evalúen los efectos de la inclusión de un extracto polifenólico de OU País solo o combinado con dosis crecientes de aceite de OU sobre la fermentación ruminal, la producción de CH_4 y las principales poblaciones microbianas.

Los resultados de los estudios previos han demostrado que un extracto polifenólico de OU País reduce la producción de CH_4, y las concentraciones de $N\text{-}NH^3$ sin afectar negativamente la fermentación ruminal. Efectos demostrados también con el uso de OU País, el cual contiene concentraciones de aceite del 16%, constituido en un 82% por ácidos grasos insaturados, cuyo potencial antimetanogénico ha sido establecido (Newbold *et al.* 2005). Por lo cual surgen interrogantes sobre los efectos del aceite de OU País sobre fermentación ruminal y la producción de CH_4, o si existen efecto de la interacción entre el los polifenoles y ácidos grasos presentes en el OU País. Por ello el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un extracto polifenólico de OU País solo o en combinación con aceite de OU en dosis crecientes (2.5% y 5% MS) a una dieta alta en forraje sobre la fermentación, la producción de CH_4 y las poblaciones microbianas, en condiciones *in vitro*.

4.2.3 Materiales y métodos

Extracto polifenólico de orujo de uva País

Un extracto polifenólico de OU País (CPT 278.9 mg GAE/g MS y PA 98.8 mg CAT/g MS), sólido, obtenido mediante extracción asistida con microondas acorde a los procedimientos descritos en el estudio 2.2 fue usado para este estudio.

Aceite de orujo de uva País

La fracción polar obtenida en el estudio 2.2 de esta tesis fue conservada en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso. El perfil lipídico del aceite obtenido indicó contenidos del 17.6% de ácidos grasos saturados, 21.89% de ácidos monoinsaturados y 60.45% de ácidos grasos poliinsaturados, representados en su totalidad por ácido linoleico.

Diseño experimental y tratamientos

Se realizó un cultivo tipo *batch* en un arreglo factorial de 2 × 3 completamente al azar, con seís tratamientos: **CON**: una dieta alta en forraje (relación forraje-concentrado 70:30) usada como control, **E**: dieta control con inclusión de 21 g/kg de extracto de orujo de uva (EOU), equivalente a 2.07 g de proantocianidinas/kg MS, **A2.5**: dieta control con inclusión de 25 g/kg aceite de OU (AOU), **A5**: dieta control con 50 g/kg de AOU, **EA2.5**: dieta control con inclusión de 21 g/kg de EOU y 25 g/kg de AOU, y **EA5**: dieta control con inclusión de 21 g/kg de EOU y 50 g/kg de AOU. Las dietas fueron isoproteicas e isofibrosas (Tabla 4.2.1), y el AOU fue incluido en sustitución porcentual del maíz grano húmedo de la dieta. Todos los ingredientes se molieron a 2 mm (molino de grano Breuer, Chile), se mezclaron, incluyendo el extracto y, a continuación, se depositaron 0.5 g de cada sustrato en bolsas filtrantes (Ankom® F57, ANKOM Technology, Macedon, NY, EE.UU.). Se incubaron cuatro botellas de cada tratamiento, tres réplicas técnicas, y una adicional para la evaluación de los cambios en la poblaciones microbianas, en cada tiempo de muestreo (24 y 48 h) y se realizaron tres incubaciones o corridas (réplicas estadísticas) en semanas consecutivas. En total se incubaron 156 botellas [{(6 tratamientos × 4 réplicas) + 2 blancos} × 2 tiempos de muestreo × 3 corridas (réplica estadística)].

Tabla 4.2.1. Ingredientes y composición química (%MS si no se indica algo distinto) de los sustratos incubados

	CON	E	A2.5	A5	EA2.5	EA5
Ingredientes						
Heno de alfalfa	500	489.5	500	500	489.5	489.5
Ensilaje de maíz	200	195.8	200	200	195.3	195.3
Harina de Soya	40	39.2	40	40	39.2	39.2
Maíz grano húmedo	150	150	125	100	125	99
Avena	100	100	100	100	95	96
Minerales	10	10	10	10	10	10
EOU	0	21	0	0	21	21
AOU	0	0	25	50	25	50
Composición química						
Materia seca, g/kg materia fresca	910	911	909	908	903	902
Materia orgánica	915	916	921	925	919	921
Proteína cruda	149	149	147	146	147	145
Cenizas totales	85	84	79	75	81	79
Extracto etéreo	22	25	38	58	42	59
Fibra detergente neutro	396	399	412	413	417	417
Fibra detergente ácido	301	295	284	289	292	294
[1]Carbohidratos no fibrosos	348	343	324	308	313	300

[1] Carbohidratos no fibrosos (CNF)= 100 – PC – EE – FDN – Cenizas.
CON: control, E: extracto de orujo de uva al 2.1% MS, A2.5: aceite de orujo de uva al 2.5% MS, A5: aceite de orujo de uva al 5% MS, EA2.5: extracto de orujo de uva al 2.1% MS+ aceite de orujo de uva al 2.5% MS, EA5: extracto de orujo de uva al 2.1% MS+ aceite de orujo de uva al 5% MS

Los procedimientos de colección y procesamiento del líquido ruminal, manejo de las vacas donadoras de este estudio, inoculación y fermentación *in vitro* en un sistema discontinuo tipo *batch* fueron descritos en el apartado *Animales y fermentación in vitro* del estudio 3.1.

Producción de metano, producción total de gas, pH y desaparición *in vitro* de la materia seca

La producción total de gas (PG) de cada botella se registró a las 12 y 24 h de incubación usando la metodología de desplazamiento de agua, la toma de muestras para determinación de las concentraciones de CH_4 por cromatografía de gases fueron descritas previamente (Punto 3.1). Las concentraciones de CH_4 se presentan como porcentaje en gas, producción (mg/g de MS) y rendimiento (mg/g de MS digerida). Los rendimientos de gas y CH_4 se estimaron como el gas neto (mL) o CH_4 (mg) en cada tiempo de muestreo, dividido por los correspondientes g de MS degradada (MSd).

El pH del medio de cultivo fue medido al final de la incubación (medidor de pH, Thermo Scientific, Orion Star A121 pH Portable Meter, USA) y las bolsas con sustrato fueron lavadas con agua destilada y secadas en horno a 55°C durante 48 h. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso y se presentó como desaparición *in vitro* de la MS (DIVMS).

Determinación de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles

Dos muestras (1.5 mL) de inóculo al inicio de la incubación (0 h) y de cada frasco, posterior a la medición del pH fueron colectadas y transferidas a frascos de microcentrífuga de 2 mL. Una muestra se destinó a la determinación del $N\text{-}NH_3$, para lo cual se mezcló con 150 µL de ácido tricloroacético (0.65 p/v), se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4ºC y almacenó a -20ºC hasta su análisis. Las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ fueron medidas con un espectrofotómetro UV-VIS (Spectroquant Pharo 300, Merck

KGaA, Alemania) a 625 nm, por el método Berthelot modificado según Rhine *et al.* (1998). La segunda muestra se usó para determinación de las concentraciones de AGV. Esta se mezcló con 300 µL de ácido metafosfórico (0.25 p/v), se filtró (ClarinertTM, 22 µm, Agela Technologies, China) y se almacenó a -20ºC hasta su análisis. Las concentraciones de AGV fueron determinadas por cromatografía gaseosa (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EE.UU.), con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (30 m × 0,250 mm × 0,25 µm; BD-FFAP, Agilent Technologies, Estados Unidos). Las condiciones del método fueron: temperatura inicial del horno 150°C, incremento de 5°C/min hasta 195°C, manteniendo durante 13 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 225°C y 250ºC, y el gas portador fue helio (28.5 cm/s). Las concentraciones se determinaron comparando el tiempo de retención y el área de pick con un estándar AGV Supelco mediante el software ChemStation v. 3.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El cálculo de N-NH_3 neto y la producción total neta de AGV se realizó usando las concentraciones de la hora 0.

Análisis químicos

Los sustratos y residuos se analizaron mediante los métodos de la AOAC (1995), descritos en el punto 2.1 de esta tesis.

Extracción de ADN y ensayo qPCR

Para la extracción de ADN, las muestras de sustrato de cada botella fueron homogenizadas y una submuestra de 300 mg fue seleccionada. La extracción del ADN microbiano, el análisis de PCR cuantitativo, los primer utilizados y el análisis de la expresión génica relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, Prevotella spp., y metanógenos totales se realizaron acorde a la metodología descrita en el punto 3.2 de esta tesis.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos el modelo incluyó el nivel de AOU, el nivel de EOU y su interacción como efectos fijos. Para los análisis de los resultados de parámetros de la fermentación ruminal, producción de gas y CH_4 se promediaron los resultados de las tres réplicas antes del análisis estadístico y esos promedios fueron la unidad estadística. Los datos del análisis molecular se transformaron a porcentaje como $(2\text{-}\Delta\Delta CT) \times 100$ y luego a escala $\log_{10}$ antes del análisis estadístico de acuerdo con Liang *et al.* (2017). Se realizó una prueba ANOVA, utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} son los datos experimentales; μ es la media global de las observaciones; α_i es el efecto fijo de la inclusión del EOU; β_j es el efecto fijo de la adición de AOU; δ_k es la incubación (efecto aleatorio); $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre EOU × AOU, y ε_{ijk} es el error.

Las medias se compararon mediante el test de Tukey y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para establecer el grado de asociación entre los parámetros de la fermentación, el rendimiento de CH_4, el N-NH_3 y las poblaciones microbianas. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando Stata Ver. 15.1 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). El índice de diversidad de Shannon del microbioma bacteriano se calculó utilizando Microsoft Excel (Microsoft Office 365).

4.2.4 Resultados

Parámetros de la fermentación ruminal

No se registraron efectos de la interacción entre el AOU y EOU sobre los parámetros de fermentación ruminal (Tabla 4.2.2). La DIVMS fue reducida en un 9% en los tratamientos A5 y EA5, por efecto del aceite de OU ($p < 0.001$), aunque no hubo diferencias entre los demás tratamientos y el control. Un incremento del factor de partición fue registrado para los tratamientos con E, EA2.5 y EA5 por efecto del extracto de OU ($p = 0.035$). La concentración total de AGV no fue afectada por los tratamientos ($p > 0.05$), ni la concentración molar de acetato ($p > 0.05$); sin embargo, la proporción molar de propionato se incremento en 16% en el tratamiento E y en 15% en el tratamiento EA5, por efecto del extracto de OU ($p = 0.001$). La proporción molar de butirato se incrementó en 14% en el tratamiento EA5 por efecto del aceite de OU ($p = 0.026$) y la relación A:P fue

afectada por el EOU (p = 0.003) y por el aceite (p = 0.009), sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos.

La concentración de N-NH_3 fue reducida en 29% en el tratamiento E, y 28% en el tratamiento EA5, por efecto del extracto de OU ($p < 0.001$), no se registró diferencias ente los demás tratamientos y la dieta control. Los ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) fueron afectados por el extracto de OU (p = 0.025), con una reducción del 18% en los tratamientos E y EA5.

Tabla 4.2.2. Efectos de la inclusión de aceite y extracto de orujo de uva País sobre los parámetros de fermentación de una dieta alta en forraje a las 24 h de fermentación en un cultivo *batch*

Parámetro	CON	E	A 2.5	A5	EA2.5	EA5	EEM	A	E	A×E
DIVMS, %	50.1^{A}	49.7^{AB}	49.5^{AB}	45.7^{B}	48.8^{AB}	45.6^{B}	0.148	<0.001	0.083	0.931
pH	6.68	6.72	6.66	6.65	6.56	6.55	0.080	0.125	0.542	0.875
$N\text{-}NH_3$, mg/dL	10.5^{A}	7.5^{B}	8.3^{AB}	8.5^{AB}	7.9^{AB}	7.6^{B}	0.350	0.436	<0.001	0.061
FP mg MSd /mL	3.8^{B}	4.6^{A}	4.3^{AB}	4.3^{AB}	4.6^{B}	4.6^{B}	0.156	0.189	0.035	0.863
AGV totales (mM)	124.9	120.6	111.5	118.4	123.4	122.8	2.723	0.403	0.220	0.131
Acetato (%)	60.9	59.2	57.5	61.3	61.6	61.1	1.352	0.495	0.424	0.236
Propionato (%)	27.9^{B}	32.5^{A}	30.4^{AB}	31.3^{AB}	32.1^{AB}	32.2^{A}	1.486	0.054	0.001	0.917
Butirato (%)	14.4^{B}	15.3^{AB}	15.7^{AB}	16.0^{AB}	16.0^{AB}	16.4^{A}	0.457	0.026	0.062	0.802
AGCR (%)	2.8^{A}	2.3^{B}	2.6^{AB}	2.8^{AB}	2.5^{AB}	2.3^{B}	0.089	0.446	0.025	0.535
A:P	2.2	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	0.091	0.003	0.009	0.429

Nota: CON: control, E: extracto de orujo de uva al 2.1% MS, A2.5: aceite de orujo de uva al 2.5% MS, A5: aceite de orujo de uva al 5% MS, EEM: error estándar de la media, A: aceite, A×E: interacción entre aceite de orujo de uva y extracto de orujo de uva, AGCR: ácidos grasos de cadena ramificada.

No se registraron efectos del aceite o el extracto de OU sobre la producción de gas analizada por materia seca incubada o materia seca digerida a las 24 y 48 h de incubación (Tabla 4.2.3). Reducciones en el porcentaje en gas (p = 0.033), producción (p = 0.041) y rendimiento de CH_4 (p = 0.042) a las 24 h de incubación, fueron registradas por efecto de la interacción aceite de OU × extracto de OU. El porcentaje de CH_4 en gas fue reducido en 17% en el tratamiento E, en 9% en el tratamiento A5, en 14% en el tratamiento EA2.5, y en 22% en el tratamiento EA5. La producción de CH_4 fue reducida en 24% en el tratamiento E, pero mayores reducciones fueron registradas en los tratamientos EA2.5 (28%) y EA5 (31%). Por su parte, el rendimiento de CH_4 presentó reducciones en los tratamientos E, con una reducción del 29%, tratamiento EA2.5 con 30% de reducción y el tratamiento EA5 con una reducción del 34%.

Tabla 4.2.3. Efectos de la inclusión de aceite de orujo de uva y extracto de orujo de uva sobre la producción de gas y metano de una dieta alta en forraje a las 24 h de fermentación en un cultivo tipo *batch*

Parámetro	CON	E	A2.5	A5	EA 2.5	EA5	EEM	A	E	A×E
Gas MS incubada, mL/g	99.0	98.4	87.4	81.7	88.5	87.2	5.385	0.277	0.435	0.074
Gas MS digerida, mL/g	182.3	185.2	162.9	182.3	182.8	175.9	9.516	0.064	0.300	0.096
CH4 (%)	12.2^{A}	10.1^{B}	11.5^{AB}	11.1^{B}	10.5^{BC}	9.5^{C}	0.157	0.021	0.148	0.033
CH_4 MS incubada, mg/g	9.9^{A}	7.5^{B}	9.1^{AB}	8.9^{AB}	7.1^{BC}	6.8^{C}	0.699	0.030	0.062	0.041
CH_4 MS digerida, mg/g	20.1^{A}	14.2^{B}	18.0^{AB}	17.5^{AB}	14.0^{BC}	13.3^{C}	1.146	0.001	0.056	0.042

Nota: CON: control, E: extracto de OU al 2.1% MS, A2.5: aceite de OU al 2.5% MS, A5: aceite de OU al 5% MS, EA 2.5: extracto de OU al 2.1%MS + aceite de OU al 2.5% MS, EA 5: extracto de OU al 2.1%MS + aceite de OU al 5% MS, EEM: error estándar de la media, A: aceite de OU País, E: extracto polifenólico de OU País, A×E: interacción entre aceite y extracto de OU País.

Efectos sobre las poblaciones microbianas

No se registraron efectos del EOU o de la interacción del AOU y el EOU sobre las poblaciones de bacterias totales ($p > 0.05$) ni sobre la riqueza microbiana, expresada mediante el índice de Shannon (Tabla 4.2.4). Se registró una reducción en las poblaciones de hongos totales por efecto de la interacción entre el aceite y el extracto de OU (p=0.049), reducciones del 5.8% y del 11,5% fueron registradas para los tratamientos EA2.5 y EA 5, respectivamente con relación al tratamiento control.

Tabla 4.2.4. Efectos de la inclusión de aceite y extracto de OU País sobre abundancia absoluta de bacterias totales y hongos totales (ng ADN/g MS), de una dieta alta en forraje a las 24 h de fermentación en un cultivo *batch*

Población	CON	E	A 2.5	A5	EA 2.5	EA5	EEM	A	E	A×E
Bacterias totales	5.2	5.4	4.3	3.8	4.9	4.6	0.188	0.120	0.153	0.139
Hongos totales	0.07^{A}	0.06^{AB}	0.07^{A}	0.06^{AB}	0.03^{B}	0.02^{B}	0.007	0.055	0.001	0.049
Índice de Shannon	3.5	3.7	3.3	3.2	3.3	3.2	0.105	0.131	0.468	0.168

Nota: CON: control, E: extracto de OU al 2.1% MS, A2.5: aceite de OU al 2.5% MS, A5: aceite de OU al 5% MS, EA 2.5: extracto de OU al 2.1%MS + aceite de OU al 2.5% MS, EA 5: extracto de OU al 2.1%MS + aceite de OU al 5% MS, EEM: error estándar de la media, A: aceite de OU País, E: extracto polifenólico de OU País, A×E: interacción entre aceite y extracto de OU País.

Se registró una reducción de las poblaciones de metanógenos totales por efecto del EOU ($p < 0.001$), del AOU ($p < 0.001$) y su interacción ($p < 0.001$) (Figura 4.2.1). Los tratamientos E y EA2.5 presentaron una reducción de 7 veces en las poblaciones de metanógenos respecto al control. Un efecto aditivo del aceite de OU y el extracto de OU fue registrado en el tratamiento EA5, con una reducción de 7.8 veces en las poblaciones de metanógenos respecto al control. Las poblaciones de *R. albus* ($p = 0.022$), *F. succinogenes* ($p = 0.004$) y Prevotella spp. ($p = 0.006$) fueron afectadas por la interacción entre aceite de OU y extracto de OU. Las poblaciones de *R. albus* fueron reducidas proporcionalmente a la concentración de aceite. No se registraron efectos en las poblaciones de *R. flavefaciens*. Las poblaciones de *F. succinogenes* y Prevotella spp., se incrementaron en los tratamientos con aceite, pero una reducción fue registrada en el tratamiento con extracto. Las poblaciones de *B. fibrisolvens* se incrementaron por efecto del AOU ($p = 0.006$) y por efecto de la interacción entre EOU y AOU ($p = 0.001$).

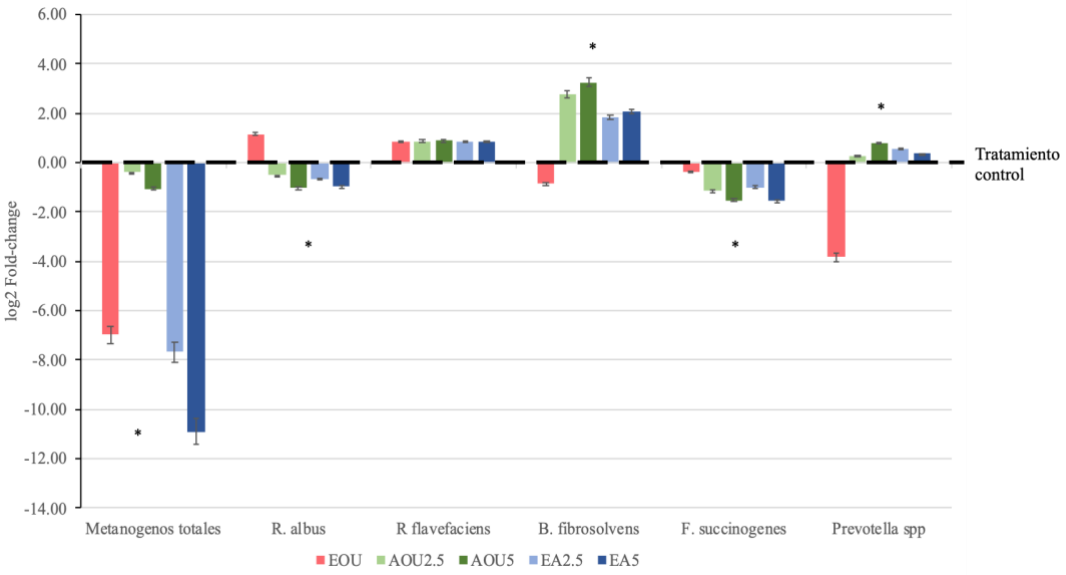


Figura 4.2.1 Cuantificación relativa de los números de copias de los principales grupos microbianos, de sustratos con extracto de orujo de uva (EOU) y aceite de orujo de uva (AOU) comparados con la dieta control a las 24 h de incubación. Los fold-change para grupos específicos de amplicones se calcularon como la relación (log 2) del número de copias normalizado. Valor de $p < 0.05$ (*).

Asociaciones entre los parámetros de fermentación ruminal, metano, los componentes de la dieta y poblaciones microbianas

El análisis de correlaciones de Pearson entre los principales parámetros de fermentación ruminal y las poblaciones de microorganismos, se presenta en la figura 4.2.2. Se estableció una asociación entre la DIVMS y el rendimiento de CH_4 (r= 0.251, $p < 0.01$), las poblaciones de metanógenos totales (r= 0.367, $p < 0.05$), las poblaciones de *F. succinogenes* (r= 0.254, $p < 0.01$), y la producción de propionato (r= -0.3518, $p < 0.05$). El rendimiento de CH_4 (mg/g MSi) se asoció positivamente con las poblaciones de bacterias totales (r= 0.2946, $p < 0.01$), de *R. albus* (r= 0.287, $p < 0.05$), y *F. succinogenes* (r= 0.284, $p < 0.05$); y negativamente con las poblaciones de Prevotella spp. (r= -0.249, $p < 0.01$) y *B. fibrisolvens* (r= -0.251, $p < 0.01$). La producción de N-NH_3 se asoció positivamente con las poblaciones de *F. succinogenes* (r= 0.243, $p < 0.01$), la producción de AGCR (r= 0.312, $p < 0.01$) y negativamente con la producción de propionato (r= -0.318, $p < 0.05$).

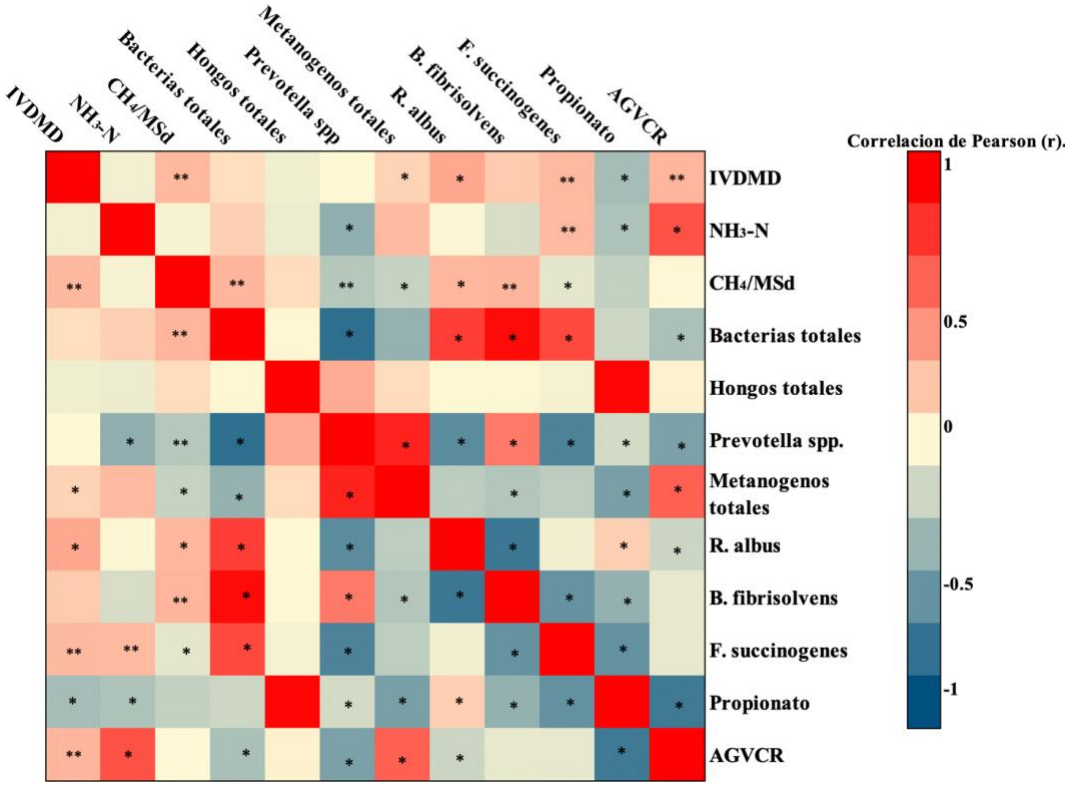


Figura 4.2.2 Heatmap de la asociación entre parámetros de fermentación ruminal, rendimiento de CH_4, los contenidos de EE y FDN de los sustratos, las poblaciones de bacterias totales, hongos totales, metanógenos totales y bacterias ruminales; con base en la puntuación del coeficiente de correlación de Pearson (r). Correlaciones estadísticamente significantes ($p<0.05$ y $p<0.01$) son indicadas con * y **.

4.2.5 Discusión

La reducción en la DIVMS registrada en este ensayo por efecto del aceite de OU al 5% coincide con los resultados de Sharifi *et al.* (2018), quienes evaluaron la inclusión de aceite de uva al 2% y 4% en una dieta forrajera en condiciones *in vivo,* sin observar reducción en la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica o proteína, pero si de la FDN a la concentración del 4%. Reducciones en la digestibilidad de la materia orgánica por interacción entre taninos y aceite en la dieta, y reducciones en la digestibilidad de la FDN y FDA por efecto aceite al 5% en dietas forrajeras han sido reportados previamente (Lima *et al.* 2019). Cieślak *et al.* (2013) reportaron la reducción en la digestibilidad *in vitro* de la FDN, pero no de la MS con la inclusión de aceite de semilla de uva al 5% en una dieta forrajera. La reducción en la digestibilidad de la fibra promovida por los aceites vegetales es resultado de un efecto físico del aceite al cubrir las partículas del alimento y los microorganismos, especialmente fibroliticos y productores de butirato (Ibrahim *et al.* 2021). Esto podría explicar la reducción en las poblaciones de *R. albus* y *F. succinogenes* en los tratamientos A5 y EA5, y la reducción de la DIVMS registrada para los tratamientos con aceite al 5% MS. Estos resultados coinciden parcialmente con los de Vargas *et al.* (2017), quienes reportaron reducciones en las poblaciones de *R. albus,* pero no de *F. succinogenes* en fermentaciones *in vitro* con aceites de girasol, oliva y linasa al 6%. Sin embargo, otros autores han reportado los efectos depresores de la suplementación con diferentes aceites sobre todas las poblaciones microbianas del rumen en condiciones *in vivo* (Vargas-Bello-Pérez *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2018) e *in vitro* (Maia *et al.* 2010). Los resultados obtenidos para los tratamientos con AOU al 2.5% coinciden con estudios previos en los cuales bajas dosis de ácidos grasos insaturados no afectaron la digestibilidad

de la materia seca de una dieta con una relación forraje-concentrado 50:50, en condiciones *in vitro* (Embaby *et al.* 2019). Ibrahim *et al.* (2018) reportaron que la inclusión de aceites de girasol, palma y oliva a 6% MS no afectó la digestibilidad aparente de la MS o de la fibra, pero sí de la proteína cruda de una dieta concentrada, y que las poblaciones de bacterias fibrolíticas no fueron afectadas por los aceites, pero las poblaciones de metanógenos fueron reducidas.

La inclusión de extracto de OU solo o en combinación con aceite no afectó la DIVMS, la producción de gas o la producción de AGV totales, resultados que coinciden con los resultados de Thanh *et al.* (2022) quienes no encontraron efectos sobre la producción de AGV o la producción de gas por la adición de proantocianidinas de semilla de uva al 0.2% y 0.4% con aceite de soya al 2.5% MS a una dieta forrajera en un cultivo *batch*. Estos autores reportaron un efecto aditivo de las proantocianidinas de semilla de uva al 0.6% y 0.8%, y aceite de soya al 2.5% MS sobre la reducción en la producción de gas y AGV totales. Estudios previos han demostrado que la adición de aceites vegetales hasta un 2.7% MS no afectan la producción de AGV o sus proporciones molares individuales (Williams *et al.* 2020). El extracto de OU País incrementó la proporción molar de propionato, lo cual coincide con resultados de Sharifi *et al.* (2018), quienes reportaron incrementos en la proporción de propionato en fluido ruminal de corderos alimentados con una dieta forrajera con inclusión de aceite de semilla de uva al 2 y 4%. Thanh *et al.* (2022) reportaron incrementos en las concentraciones molares de ácido propiónico y la reducción de la relación A:P con proantocianidinas de semilla de uva en concentraciones desde 0.4% MS y 2.5% MS de aceite de soya en fermentaciones *in vitro*

de una dieta alta en forraje. El incremento de las concentraciones molares de butirato puede deberse parcialmente al incremento de las poblaciones de *B. fibrisolvens*, principal productor de butirato en el rumen (Dewanckele *et al.* 2020). Éstas fueron incrementadas 2.5 y 3 veces por la adición de aceite de OU en concentraciones de 2.5 y 5% MS. El incremento de las poblaciones de *B. fibrisolvens* en condiciones *in vivo* por el efecto combinado de aceite de soya y taninos de quebracho (Buccioni *et al.* 2015) y por la adición de aceites vegetales hasta un 5% MS (Mirzaei-Alamouti *et al.* 2021) han sido previamente reportados.

Las reducciones del 28 y 29% en la producción de N-NH_3 y del 18% en las concentraciones molares de los ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) por efectos del extracto de OU registradas en este estudio coinciden con los resultados de Williams *et al.* (2020) quienes reportaron reducciones del N-NH_3 del 17% por efecto del suministro de taninos (400g/día) en condiciones *in vivo*, con los de Menci *et al.* (2021), quienes reportaron reducciones en las concentraciones de N-NH_3 y de los ácidos grasos de cadena ramificada por efecto de taninos condensados en una dieta forrajera; y con los de Chen *et al.* (2021) quienes reportaron reducciones del 26% en las concentraciones de N-NH_3 en fermentaciones *in vitro* de alfalfa con una mezcla de TC y taninos hidrolizables. La reducción en las poblaciones de Prevotella spp. por efecto directo de los TC, se asocia a una reducción en la fermentación de la proteína de la dieta, reduciendo la producción de ácidos grasos de cadena ramificada y de amonio en rumen (Tan *et al.* 2021).

En este ensayo no se registraron efectos en la producción de N-NH_3 en los tratamientos con aceite de OU, solo o cuando la concentración del 2.5% MS se combinó con el extracto de OU. Estos resultados coinciden con los de Thanh *et al.* (2022) quienes no encontraron efectos sobre la producción de N-NH_3, pero si sobre las proporciones molares de isobutirato e isovalerato por la interacción de aceite de soya al 2.5% MS y dosis crecientes de proantocianidinas de semilla de uva en fermentaciones *in vitro*. La falta de efectos en la producción de N-NH_3 en los tratamientos con A2.5 y A5 podría ser resultado del incremento de las poblaciones de Prevotella spp. y de *B. fibrisolvens* por efecto de la inclusión de aceite de OU, poblaciones que fueron superiores a las del tratamiento con EOU solo o en combinación con aceite. Se ha establecido que la adición de ácidos grasos poliinsaturados a la dieta incrementa las poblaciones de Prevotella spp. y *B. fibrisolvens* dependiendo la dosis (Vargas-Bello-Pérez *et al.* 2016; Ebeid *et al.* 2020).

Reducciones en la producción de CH_4 por efecto de extractos polifenólicos, taninos hidrolizables y TC han sido ampliamente reportadas previamente (Sinz *et al.* 2019; Vasta *et al.* 2019; Vera *et al.* 2022). Múltiples mecanismos se han propuesto para explicar la reducción en la producción de CH_4 por efecto de los taninos en la dieta, entre los cuales se describen una reducida disponibilidad para la metanogénesis (H_2 y CO_2) por el deterioro de la fermentación de la fibra, resultado de la inhibición de las enzimas microbianas, bloqueo de la adhesión de los microorganismos a las paredes celulares de la fibra, o alteración en la funcionalidad de los microorganismos ruminales (Hassan *et al.* 2020). Adicionalmente, la formación de complejos tanino-carbohidratos (Barrett *et al.* 2018), y la toxicidad directa sobre los metanógenos (Saminathan *et al.* 2016) reducen la

producción de CH_4. La reducción en el rendimiento de CH_4 registrado en este estudio en los tratamientos E (29%) y EA2.5 (30%) está asociada la reducción las poblaciones de metanógenos totales, lo que coincide con los resultados de Zhang *et al.* (2020), quienes reportaron reducción de las poblaciones de arqueas metanogénicas del rumen por efecto de las proantocianidinas de la semilla de uva (0.2% MS). En estos tratamientos también se registró un incremento en la proporción molar de propionato, lo cual está asociado a la reducción en la producción de CH_4 (Ungerfeld, 2015). Múltiples estudios han demostrado que el uso de compuestos secundarios de las plantas como los taninos incrementan la producción de propionato generando una menor producción de CH_4 (Lan y Yang, 2019). Por otra parte, una reducción de mayor magnitud (34%) en el rendimiento de CH_4 fue registrada para el tratamiento AE5, la cual a diferencia de los tratamientos E y EA2.5, además de las reducciones en las poblaciones de metanógenos totales y el incremento de la producción de propionato, puede ser influenciada por una reducción en la fermentación de la materia seca y la fibra, inducida por la reducción de microorganismos fibrolíticos (hongos totales, *R. albus* y *F. succinógenes*).

Aunque estos resultados sugieren un efecto aditivo entre el extracto polifenólico de orujo de uva y el aceite de orujo de uva, las diferencias porcentuales en la reducción del rendimiento de CH_4 entre el tratamiento con extracto solo y en combinación con aceite de orujo de uva (29%, para tratamiento con extracto solo, 30%, para el tratamiento de extracto con aceite al 2.5%, y 34% para el tratamiento de extracto con aceite al 5%) sugieren un mayor potencial antimetanogénico del extracto polifenólico de OU que el potencial de la fracción lipídica. Estos resultados contradicen los resultados de Moate *et al.* (2020)

quienes indicaron un bajo potencial antimetanogénico a los TC del orujo de uva, sugiriendo que la reducción en la producción de CH_4 por efecto del OU es el resultado aditivo de los contenidos de lípidos, lignina y TC en el OU. El potencial antimetanogénico del EOU País puede ser resultado de la composición y estructura de los compuestos fenólicos presentes. Hixson *et al* (2018) establecieron que OU con taninos más pequeños y extraíbles es más eficaz para reducir la metanogénesis. Las proantocianidinas del OU País se caracterizan por un mDP de 9.2 y un peso molecular promedio de 3019 Da, siendo el 59% de las moléculas, de bajo peso molecular (Figueroa *et al.* 2020).

4.2.6 Conclusión

La inclusión de aceite por sí sola no redujo las emisiones de CH_4 por materia seca incubada o digerida, o la producción de N-NH_3, además la concentración del 5% impactó negativamente la DIVMS y redujo las poblaciones de las principales poblaciones fibrolíticas del rumen (*R. albus*, *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*), aunque incrementó las poblaciones de *B. fibrosolvens*. Un efecto aditivo de la inclusión de extracto polifenólico y el aceite de OU redujo las poblaciones de metanógenos totales e incrementó la producción de propionato, lo cual se reflejó en una reducción en la producción y el rendimiento de CH_4. Sin embargo, comparando la magnitud de las reducciones en las emisiones, es posible establecer un mayor potencial antimetanogénico del extracto polifenólico de OU País, con la reducción adicional de la producción de N-NH_3. Es necesario realizar estudios *in vivo* con el fin de establecer si estas concentraciones afectan

el comportamiento alimentario, los protozoos ruminales y la digestibilidad de nutrientes, así como establecer la persistencia de estos efectos en el mediano y largo plazo.

DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis evaluó el potencial del OU País, subproducto de la industria vitivinícola para ser usado como ingrediente y como fuente de compuestos polifenólicos para la alimentación de rumiantes, y su potencial para reducir los impactos ambientales de la producción ganadera. Se analizó la información disponible de los últimos 10 años sobre el uso de OU en la alimentación de rumiantes y realizaron seis estudios que abordaron las siguientes etapas: Capítulo 2: 1) identificación del perfil nutricional, contenidos de compuestos bioactivos e identificación de un método de secado para la conservación y extensión de la vida útil de este recurso. Estudio que permitió establecer que el secado en horno a 60 ºC durante 48 h reduce los contenidos de humedad, mejorando el perfil químico del OU, permite la retención de altas proporciones de polifenoles y la capacidad antioxidante del OU, por cual es una buena alternativa para conservar el OU País más allá de la temporada de producción. Los resultados de fermentación del OU sugieren que este podría ser incorporado como ingrediente en dietas para rumiantes. Sin embargo, considerando que los compuestos bioactivos del OU tienen diferentes comportamientos según el tipo de dieta evaluada, y que su uso como ingrediente tiene la finalidad de sustituir fuentes de fibra, se propuso la evaluación *in vitro* de la dosis optima de inclusión en dietas con diferentes relaciones forraje-concentrado, impactos sobre los parámetros de fermentación ruminal, digestibilidad de nutrientes y potencial del OU País para mitigar

las emisiones de metano de los rumiantes (Estudio 3.1). Este estudio estableció que la sustitución parcial de heno mixto por OU País hasta un 10% de la MS en dietas altas y bajas en fibra, en condiciones *in vitro* tiene el potencial de reducir las concentraciones de $N\text{-}NH_3$ sin afectar negativamente los parámetros de fermentación ruminal. Sin embargo, su inclusión al 20% MS reduce la producción y el rendimiento de CH_4, pero reduce la DIVMS en 5%, la producción de AGV totales en 6,5% y la producción de gas en 7,5%. En consecuencia, se diseñó un estudio de fermentación semi continuo (Rusitec) para identificar los mecanismos por los cuales el OU reduce CH_4, $N\text{-}NH_3$, afecta la digestibilidad de los nutrientes y las poblaciones microbianas. El estudio 3.2 evaluó los efectos de la inclusión de OU País al 20% MS en dietas para rumiantes altas (AF) y bajas (BF) en forraje sobre los parámetros de fermentación, producción de CH_4 y poblaciones microbianas ruminales en un sistema de fermentación semicontinuo Rusitec. Se demostró que OU País puede ser incluido al 20% MS en dietas altas en forraje en sustitución de heno mixto sin comprometer la digestión de nutrientes y la fermentación ruminal, pero su uso en dietas bajas en forraje en sustitución de ensilaje de maíz puede afectar la digestibilidad de nutrientes, especialmente de fibra. Además, el uso de OU genera reducción en la degradación ruminal de la proteína y de la produccion de $N\text{-}NH_3$. La formación de complejos tanino-proteina parece ser la causa de estos resultados dado que no se registraron efectos sobre las poblaciones ruminales vinculadas a la proteólisis (Prevotella spp. y *Butyrivibrio fibrisolvens*). Una marcada reducción de metanógenos se registró al final de la incubación por efecto del OU corrobora que los efectos del OU País sobre las emisiones de CH_4 se asocian a inhibiciones sobre los microorganismos

vinculados con la metanogénesis. Por otra parte, los contenidos de polifenoles totales y proantocianidinas del OU País, obtenidos en el experimento 2.1, indicaron el potencial de uso del OU País como aditivo para la reducción de las emisiones de CH_4 y la excreción de nitrógeno, por lo cual se propuso generar un extracto polifenólico estandarizado de OU País mediante la metodología de extracción asistida por microondas (Estudio 2.2), obteniendo un extracto con contenidos de TC y polifenoles superiores a los de otros extractos usados en nutrición de rumiantes y una alta capacidad antioxidante, quedando por evaluar su actividad biológica y sus efectos sobre la producción de metano entérico. El estudio 4.1 evaluó los efectos de un extracto polifenólico de orujo de uva País (EOU) sobre los parámetros de fermentación ruminal, desaparición de nutrientes, producción de CH_4 y las poblaciones de metanógenos, hongos y principales bacterias fibrolíticas del rumen, en un sistema de fermentación semicontinuo Rusitec.

La inclusión de EOU hasta 2.1% MS en dietas forrajeras reduce la producción y el rendimiento de CH_4 hasta un 30%, por efecto directo del EOU sobre las poblaciones de metanógenos, la producción diaria de $N\text{-}NH_3$ hasta un 30%, por efectos sobre las poblaciones de *Prevotella spp.* y la formación de complejos tanino-proteína. El uso de EOU no afectó las poblaciones fibrolíticas, la DIVMS, ni la fermentación ruminal. Las escasas diferencias en las emisiones de CH_4, poblaciones microbianas ruminales y en la producción de $N\text{-}NH_3$ obtenidas en los ensayos con OU País y con EOU, junto con la falta de conocimiento sobre los efectos solos o combinados de polifenoles y lípidos de OU, resultaron en la formulación del estudio 4.2, que tuvo como objetivo determinar el efecto de un extracto polifenólico de orujo de uva (EOU) País solo o en combinación con aceite

de OU en dosis crecientes (2.5% y 5% MS) a una dieta alta en forraje sobre la fermentación, la producción de CH_4 y las poblaciones microbianas, en condiciones *in vitr*o. En el cual se estableció que la inclusión de aceite de OU solo en concentraciones hasta del 5% MS no reduce las emisiones de CH_4 o la producción de N-NH_3, además la concentración del 5% impacta negativamente las poblaciones fibrolíticas del rumen (*R. albus, R. flavefaciens* y *F. succinogenes*) y la DIVMS. Una reducción en las poblaciones de metanógenos totales y el incremento en la producción de propionato, con la consecuente reducción en la producción y el rendimiento de CH_4.

El OU puede ser una fuente alternativa de alimento para animales; sin embargo, una limitante para su uso es el alto contenido de humedad, que limita su vida útil y almacenamiento por largos periodos. Los contenidos de humedad de OU País fresco evaluado en esta tesis fueron de 63%, lo que está dentro del rango de 50-72% de referencia reportados previamente. Los procesos de secado del OU, particularmente temperaturas y tiempos de exposición determinan la estabilidad de los compuestos fenólicos (Guaita *et al.* 2021). Las altas temperaturas degradan los polifenoles, afectan la actividad antioxidante (Vashisth *et al.* 2011) y reducen los contenidos de proantocianidinas (Pires *et al.* 2021). El secado a 60ºC por 48 horas en horno redujo el contenido de humedad del OU País al 5.5%, reduciendo en bajas proporciones los contenidos de compuestos bioactivos, comparado con investigaciones previas (Teles *et al.* 2018). Los contenidos de polifenoles totales y de proantocianidinas del OU País secado en estas condiciones fueron superiores a los de OU usados previamente en alimentación de rumiantes (Moate *et al.* 2020; Vinyard *et al.* 2021). El OU País posee contenidos de extracto etéreo que exceden

los rangos recomendable para la fermentación ruminal y podrían ser tóxicos para los microorganismos ruminales. Adicionalmente, los contenidos de proteína del OU País son menores a los requerimientos mínimos (120-180 g/kg MS) para el correcto funcionamiento de los microorganismos fibrolíticos del rumen (Schwab *et al.* 2005). Estos resultados sugieren que el uso de OU País como fuente alimenticia única para rumiantes no es una estrategia viable en sistemas productivos eficientes, y que su incorporación en dietas para rumiantes requiere la inclusión de fuentes proteicas de mayor calidad o considerar la incorporación de fuentes adicionales de nitrógeno. Los contenidos de FDN, lignina y energía metabolizable del OU País fueron ligeramente menores a los contenidos de OU usado en alimentación de rumiantes en investigaciones previas (Hixson *et al.* 2018, Vinyard *et al.* 2021, Tayengwa *et al.* 2021). La DIVMS de OU País fue baja (≈20%) posiblemente por efecto de los altos contenidos de ceniza, lignina, extracto etéreo y los taninos condensados, los cuales inhiben los microorganismos y las enzimas fibrolíticas, reduciendo la digestibilidad de la MS (Vasta *et al.* 2019). El potencial antimetanogénico del OU se ha asociado a sus contenidos de taninos condensados (Moate *et al.* 2014; Hixson *et al.* 2016), los altos contenidos de proantocianidinas en OU País sugieren un alto potencial antimetanogénico.

La inclusión de OU País en dietas altas en forraje no afectó la desaparición *in vitro* de la materia seca en ninguno de los estudios. La inclusión de OU 20% MS en una dieta baja en forraje redujo la desaparición *in vitro* de la materia seca en sistema Rusitec, pero no en el sistema *batch*, aunque en este último si redujo la producción de gas y las concentraciones totales de AGV. Esto puede ser resultado del incremento en los

contenidos de carbohidratos estructurales y lignina en la dieta por la inclusión de OU País al sustituir una fuente forrajera de mejor calidad nutricional, más que un posible efecto de los TC presentes en el OU. La inclusión de OU modificó la estructura de las poblaciones microbianas ruminales, reduciendo las poblaciones de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* pero incrementando las poblaciones de *B. fibrisolvens* y de hongos totales, esta redundancia funcional podría explicar la baja magnitud del efecto registrado en la desaparición de la fibra y la MS. Los efectos del OU País sobre las poblaciones fibrolíticas pueden ser resultado de los contenidos de ácidos grasos del OU ya que la suplementación con ácidos grasos C-18 afecta las poblaciones de microorganismos fibroliticos (Ivan *et al.* 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que los polifenoles modulan las poblaciones de microorganismos fibroliticos como *R. flavefaciens* y *R. albus* (Demirtas *et al.* 2021).

La inclusión de OU País al 20% de la dieta afectó las concentraciones de N-NH_3 sin importar el tipo de dieta, alcanzando reducciones del 58% en *batch*, y del 21% en en Rusitec. De manera semejante, redujo la producción de ácidos grasos de cadena ramificada, en los dos ensayos y la desaparición *in vitro* de la proteína, en Rusitec. El análisis de qPCR no evidenció reducciones sobre las poblaciones de *Prevotella Spp.*, bacterias ruminales con actividad proteolítica, por efecto del OU, lo que sugiere que los resultados son consistentes con un deterioro de la proteólisis por formación de complejos tanino-proteína y no por efecto directo sobre la actividad microbiana. Aunque en el ensayo en *batch* las reducciones en la producción de N-NH_3 fueron superiores a cualquier ensayo con OU, los resultados obtenidos en el ensayo Rusitec son semejantes a reportes previos (Moate *et al.* 2020; Tayengwa *et al.* 2021 y Ream *et al.* 2021).

Independientemente del tipo de dieta la inclusión de OU 20% MS redujo el rendimiento de CH_4 en 13% en el estudio realizado en *batch*. Sin embargo, la inclusión de OU 20% redujo el rendimiento de CH_4 en 18% para la dieta alta en forraje y en 14% en la dieta baja en forraje, en el estudio realizado en Rusitec. Estudios previos indicaron que las reducciones en la producción y rendimiento de CH_4 son resultado de los contenidos de lípidos, lignina y TC del OU (Moate *et al.* 2014, Hixson *et al.* 2018, Moate *et al.* 2020). Estos autores indicaron que los TC del OU no son moléculas antimetanogénicas especialmente potentes y que las variedades de OU con alto contenido de grasa afectan la fermentación ruminal, reduciendo la producción de gas y las concentraciones de AGV, reduciendo así la producción de CH_4, y las variedades OU con mayores concentraciones de taninos de menor peso molecular tienen un mayor potencial antimetanogénico. Los débiles efectos sobre la desaparición de la fibra, la DIVMS, y las reducciones de las poblaciones totales de metanógenos por la inclusión de OU 20% MS indistintamente del tipo de dieta, indican que las reducciones son resultado del efecto directo de los TC y la grasa del OU sobre los microorganismos involucrados en la metanogénesis. Los resultados establecieron que el OU País es rico en ácido gálico, cafeico, cumárico, catequina y epicatequina; y los flavonoles quercetina y kaempferol, compuestos que han demostrado potencial antimetanogénico (Oskoueian *et al.* 2013, Becker *et al.* 2014, Huyen *et al.* 2016). Además, Figueroa *et al.* (2020) establecieron que el 58.9% de los polifenoles de las semillas de uva País son de bajo peso molecular y grado de polimerización media de 9.2, los cuales de acuerdo con Hixson *et al.* (2018) poseen un mayor potencial

antimetanogénico. Adicionalmente, el OU País tiene altos contenidos de ácidos linoleico y oleico, que constituyen cerca del 80% de los ácidos grasos.

La inclusión de dosis crecientes hasta el 2.1% MS de un extracto polifenólico de OU País (CPT: 287.3 mg GAE/g MS y PA 98.8 mg CAT/g MS) en una dieta alta en forraje no afectó la DIVMS, la DVMS, la producción de gas, o de AGV, pero si la desaparición *in vitro* de la fibra y la proteína en un sistema Rusitec. Sin embargo, se registró un efecto importante del EOU sobre el metabolismo del nitrógeno relacionado con la concentración de extracto en la dieta, alcanzando reducciones del 30% en la producción diaria de $N\text{-}NH_3$, del 32% en la proporción molar de AGV de cadena ramificada y del 24% de la proteína cruda con la inclusión de extracto al 2.1% MS. Así mismo, se registró una reducción en la producción de CH_4 por materia seca incubada y en el rendimiento de CH_4 (mg/gMSd) proporcional al incremento de la concentración de EOU en la dieta, alcanzando el 29% para la producción y del 14% en el rendimiento de CH_4 con la concentración de 2.1%. El extracto de OU País no afectó la diversidad, pero si la estructura de las poblaciones microbianas, con reducción de las poblaciones de *F. succinogenes*, e incrementos en las poblaciones de *R. albus*, de *R. flavefaciens* y de hongos. Los resultados sobre el metabolismo ruminal indican reducción en la proteólisis, la cual es resultado de la formación de complejos tanino-proteína por una mayor afinidad de los TC del EOU con las proteínas, como lo establecieron Huyen *et al.* (2016), y Patra y Saxena (2011). Estos resultados también pueden atribuirse a los efectos de los polifenoles del extracto sobre las poblaciones de bacterias proteolíticas, como lo evidencia la reducción en la producción de ácidos grasos de cadena ramificada. Las reducciones en la producción y rendimiento

de CH_4 en este ensayo pueden ser explicados por un efecto aditivo de la alteración de la vía hidrogenotrópica, resultado de la reducción en la disponibilidad de H_2, la toxicidad de los metanógenos y en menor proporción por la captación de H_2 por las unidades monomericas flavan-3-ol presentes en el EOU.

Previamente se estableció que la reducción en las emisiones de CH_4 por el uso de OU en dietas de rumiantes podrían ser un efecto aditivo de los contenidos de TC y de la grasa. Altas dosis de aceite en la dieta afectan la fermentación ruminal (Ibrahim *et al.* 2021) y como era de esperarse en este estudio la inclusión de aceite de OU al 5% redujo la DIVMS, lo cual es resultado de la reducción en las poblaciones de *R. albus* y *F. succinogenes*, por un efecto físico del aceite al cubrir las partículas del alimento y los microorganismos, especialmente fibroliticos y productores de butirato (Ibrahim *et al.* 2021). Por su parte, la inclusión de extracto de OU solo o en combinación con aceite no afectó la DIVMS, la producción de gas o la producción de AGV totales, resultados que coinciden con los resultados de otros estudios en los que se evaluó la interacción entre proantocianidinas de semilla de uva y aceites (Thanh *et al.* 2022). Un incremento en la proporción molar de propionato, coincidió con las reducciones en el rendimiento de CH_4 producidos por efecto del extracto de OU País. Como se indicó previamente múltiples mecanismos pueden explicar la reducción en la producción de CH_4 por efecto de los taninos en la dieta. Una baja disponibilidad de sustratos para la metanogénesis (H_2 y CO_2) por el deterioro de la fermentación de la fibra, inhibición de las enzimas microbianas fibrolíticas, bloqueo de la adhesión de los microorganismos a las paredes celulares de la fibra, o alteración en la funcionalidad de los microorganismos ruminales (Hassan *et al.*

2020), formación de complejos tanino-carbohidrato (Barret *et al.* 2018), y toxicidad directa sobre los metanógenos (Saminathan *et al.* 2016). En este estudio se estableció que tanto el extracto de OU como el aceite de OU reducen las poblaciones de metanógenos totales, aunque en los tratamientos en los que se combinó extracto con aceite de OU no se pudo registrar un efecto aditivo entre del potencial de reducción de estos dos componentes, además aunque se registró una mayor reducción en el rendimiento de CH_4 en el tratamiento de extracto con aceite al 5% (34%) comparado con la reducción generada por el extracto solo (29%), esta diferencia no parece ser resultado de efecto aditivo sobre las poblaciones de metanógenos totales y parece ser resultado de la reducción en la fermentación de la materia seca y la fibra, inducida por la reducción de microorganismos fibrolíticos (hongos totales, *R. albus* y *F. succinógenes*) como se registró en el tratamiento con aceite de OU al 5%MS. Estos resultados sugieren un mayor potencial antimetanogénico del extracto polifenólico de OU País que de la fracción lipídica, contradiciendo resultados previos que establecieron un bajo potencial antimetanogénico a los TC de OU (Moate *et al.* 2020). Estos resultados parecen confirmar que el potencial antimetanogénico del EOU País puede ser resultado de la composición y estructura de los compuestos fenólicos presentes en el. Sin embargo, estudios con compuestos fenólicos purificados serían necesarios para confirmar esta hipótesis.

El extracto de OU País redujo la producción de $N\text{-}NH_3$, las concentraciones molares de los ácidos grasos de cadena ramificada y las poblaciones de Prevotella spp. y no se registraron efectos en la producción de $N\text{-}NH_3$ en los tratamientos con aceite de OU, solo o cuando combinados con el extracto de OU. Lo cual como fue discutido previamente

puede ser resultado de la formación de complejos tanino-proteína y los efectos tóxicos de los TC sobre las poblaciones de Prevotella spp. La falta de efectos en la producción de N-NH_3 en los tratamientos con aceite solo podría ser resultado del incremento de las poblaciones de Prevotella spp. y de *B. fibrisolvens* por efecto de la inclusión de aceite de OU. La figura 5.1 presenta los posibles efectos del aceite y del extracto de OU País sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis en función de los cambios en las poblaciones microbianas.

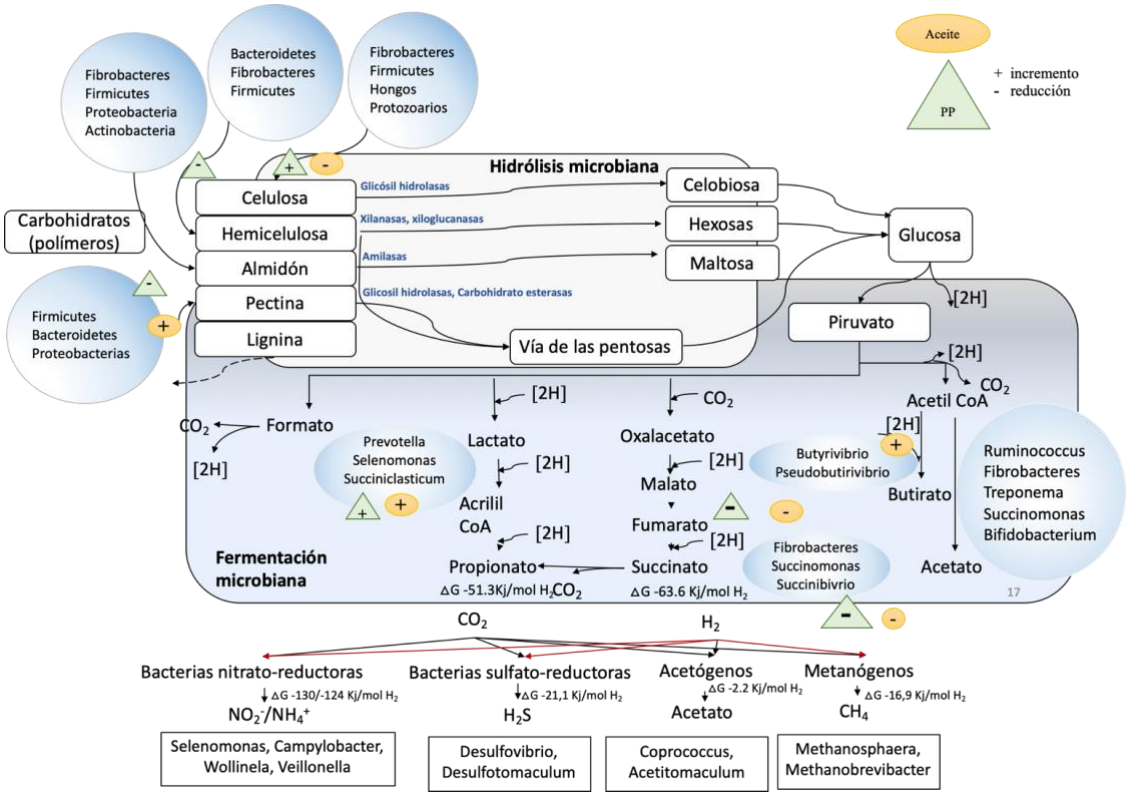


Figura 5.1. Efectos del aceite y extracto polifenólico de OU país sobre los microorganismos vinculados a la fermentación ruminal y la metanogénesis (elaboración propia)

CONCLUSION GENERAL

El orujo de uva País seco es un recurso con potencial de uso en la alimentación de rumiantes, que puede ser usado como sustituto parcial (hasta 20% MS) de fuentes de forraje de calidad baja, por lo cual podría ser incorporado en sistemas ganaderos, con los beneficios de reducir las poblaciones de metanógenos ruminales y las emisiones de CH_4, reducir la fermentación de la proteína, y reducir la excreción de N-NH_3. Además es una buena fuente de compuestos bioactivos, particularmente taninos condensados, por ello la extracción de compuestos bioactivos del OU País, podría ser una estrategia de valorización de este subproducto, que permitiría obtener un aditivo alimentario para rumiantes con efectos importantes en la modulación de la fermentación ruminal, las poblaciones microbianas las emisiones de CH_4 y la fermentación de la proteína, incrementando la eficiencia energética y alimentaria de los rumiantes, reduciendo la excreción de N reactivo.

FUTURAS INVESTIGACIONES

Pocos estudios han relacionado en un mismo ensayo las variaciones de la producción de CH_4 con las características del ecosistema microbiano ruminal por efecto del uso de OU o de sus polifenoles. La originalidad de este enfoque de estudio consiste en combinar un enfoque cuantitativo (parámetros de la fermentación ruminal y producción de CH_4 con un enfoque integrador (parámetros microbianos) de los procesos digestivos para comprender los fenómenos observados. Las técnicas *in vitro* utilizadas en esta tesis son métodos rápidos de caracterización de la fermentación ruminal y evaluación del potencial nutricional y de mitigación del CH_4 de alimentos potenciales como el OU País. Aunque la integración del conjunto de los datos recogidos permite una mejor comprensión de la metanogénesis ruminal y de los fenómenos biológicos asociados. Así como del potencial de uso del OU País como alternativa alimentaria y como fuente de aditivos para la reducción de impactos ambientales de la producción de rumiantes, es necesario realizar estudios *in vivo* con el fin de establecer los efectos de estos sobre el comportamiento alimentario, los protozoos ruminales y la digestibilidad de nutrientes, así como establecer la persistencia de estos efectos en el mediano y largo plazo. Además, dichos ensayos de alimentación a largo plazo deberían evaluar animales en diferentes etapas productivas (de crecimiento y producción), en los cuales se incluyan aspectos sanitarios, a fin de corroborar resultados de estudios previos que han demostrado que el uso de OU reduce moderadamente los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo en vacas en transición del final de la gestación al principio de la lactancia, e incrementa el valor nutricional del

calostro y los ácidos grasos poliinsaturados en leche. Un paso adicional en la generación de conocimiento necesariamente debe incluir un análisis de ciclo de vida, que permita una evaluación integradora de los posibles impactos ambientales derivados de la incorporación de este residuo a los sistemas de alimentación animal.

REFERENCIAS

Aboagye IA, Beauchemin KA. 2019. Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: A review. Animals. 9:856.

Adejumo I, Adebiyi O. 2020. Agricultural solid wastes: causes, effects, and effective management. In Strategies of Sustainable Solid Waste Management. Hosam Saleh. London: IntechOpen.

Aguilar T, De Bruijn J, Loyola C, Bustamante L, Vergara C, Von Baer D, Mardones C, Serra I. 2018. Characterization of an Antioxidant-Enriched Beverage from Grape Musts and Extracts of Winery and Grapevine By-Products. Beverages. 4(1):4.

Aguilar T, Loyola C, de Bruijn J, Bustamante L, Vergara C, von Baer D, Mardones C, Serra I. 2016. Effect of thermomaceration and enzymatic maceration on phenolic compounds of grape must enriched by grape pomace, vine leaves and canes. Eur Food Res Technol 242:1149 – 1158.

Ajila C, Brar S, Verma M, Tyagi R, Godbout S, Valéro J. 2012. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. Crit. Rev. Biotechnol. 32, 382–400.

Alba DF, Campigotto G, Cazarotto CJ, Dos Santos DS, Gebert RR, Reis JH, Souza CF, Baldissera MD, Gindri AL, Kempka AP, Palmer EA, Vedovatto M, Da Silva AS. 2019. Use of grape residue flour in lactating dairy sheep in heat stress: effects on health, milk production and quality. J. Therm. Biol. 82, 197–205.

Alexandre EMC, Moreira SA, Castro LMG, Pintado M, Saraiva JA. 2018. Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. Food Rev Int 34:581–612.

Alipour D, Rouzbehan Y. 2010. Effects of several levels of extracted tannin from grape pomace on intestinal digestibility of soybean meal. Liv. Sci. 128(1-3): 87-91.

Amanullah SM, Lee S-S, Paradhipta DHV, Joo Y-H, Kim D-H, Seong P-N, Jeong S-M, Kim S-C. 2022. Impact of Oil Sources on In Vitro Fermentation, Microbes, Greenhouse Gas, and Fatty Acid Profile in the Rumen. Fermentation. 8(5):242.

Amaral FP, Grazziotin RCB, Machado MC, Hasse L, Frata M, Blanco CS, Brauner CC. 2019. Limits of grape byproduct inclusion in diets for lambs: Zinc supplementation to prevent copper poisoning. Research in veterinary science, 124, 334-337.

Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B. 2020. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. Foods. 9(11):1627.

Antoniolli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. Food Chemistry 178:172– 178.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. (Arlington: Association of Official Analytical Chemists).

Arndt C, Hristov AN, Price WJ, McClelland SC, Pelaez AM, Cueva SF, Yu, Z. 2022. Full adoption of the most effective strategies to mitigate methane emissions by ruminants can help meet the 1.5° C target by 2030 but not 2050. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(20), e2111294119.

Atalay Aİ. 2020. Determination of nutritive value and anti-methanogenic potential of Turkish grape pomace using in vitro gas production technique. JAPS. 30(4).

Avila AS, Zambom MA, Faccenda A, Fischer ML, Anschau FA, Venturini T, Tinini RCR, Dessbesell JG, Faciola AP. 2020. Effects of black wattle (*Acacia mearnsii*) condensed tannins on intake, protozoa population, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in Jersey steers. Animals. 10:1011.

Avila-Stagno J, Chaves AV, Ribeiro GO, Ungerfeld EM, McAllister TA. 2014. Inclusion of glycerol in forage diets increases methane production in a rumen simulation technique system. Br. J. Nutr.,111(5), 829-835.

Ayoo C, Bonti-Ankomah, S. 2020. Economic impacts of value addition to agricultural byproducts. Simpson, B. K., Aryee, A. N. A. and Toldra, F (Eds.) Byproducts from agriculture and fisheries: adding value for food, feed, pharma, and fuels. Chichester-UK: Johns Wiley & Sons Ltd. 685-698.

Babău PD, Eleonora N, Dobrei A. 2019. Research on the grape by-products used in livestock feeding. J. Hort. Forest Biotech. 23(3):48-53.

Bahrami Y, Foroozandeh AD, Zamani F, Modarresi M, Eghbal-Saeid S, Chekani-Az S. 2010. Effect of diet with varying levels of dried grape pomace on dry matter digestibility and growth performance of male lambs. J. Anim. Plant Sci. 6:605–610.

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), 34-40.

Barrett AH, Farhadi N F, Smith TJ. 2018. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins—A review of efficacy and mechanisms. LWT, 87, 394-399.

Barriga-Sanchez M, Campos Martinez M, Cáceres Yparraguirre H, Rosales-Hartshorn, M. 2022. Characterization of Black Borgoña (Vitis labrusca) and Quebranta (Vitis vinifera) grapes pomace, seeds and oil extract. Food Sci. Technol. 42.

Baumgärtel T, Kluth H, Epperlein K, Rodehutscord M. A 2007. Note on digestibility and energy value for sheep of different grape oomace. Small Rumin. Res. 67:302–306

Becker PM, van Wikselaar PG, Franssen MC, de Vos RC, Hall RD, Beekwilder J. 2014. Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+) catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. Metabolomics. 10(2):179-189.

Bender ABB, Speroni CS, Moro KIB, Morisson FDP, dos Santos DR, da Silva LP, Penna NG. 2020. Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate. LWT.117.108652.

Beres C, Costa G N, Cabezudo I, da Silva-James N K, Teles A S, Cruz A P. 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. J. Waste Manag. 68:581–594.

Bharathidhasan, A. 2018. Effect of standard tannin on in vitro rumen methane reduction and rumen fermentation characteristics. Open access policy. 47(4):1379-1391.

Bjorklund G, Chirumbolo S. 2017. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. Nutrition, 33, 311–321.

Black JL, Davison TM, Box I. 2021. Methane Emissions from Ruminants in Australia: Mitigation Potential and Applicability of Mitigation Strategies. Animals. 11(4): 951.

Blümmel M, Steingass H, Becker K. 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the pre- diction of voluntary feed intake of roughages. Br. J. Nutr. 77:911–921.

Brahim M, Gambier, F, Brosse N. 2014. Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. Industrial Crops and Products.52:18-22.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT—Food Sci. Technol. 28:25–30.

Brenes A, Viveros A, Chamorro S, Arija, I. 2016. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. Anim. Feed. Sci. Technol. 211, 1-17.

Buccioni A, Pauselli M, Viti C, Minieri SARA, Pallara G, Roscini V, Mele M. 2015. Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. Journal of Dairy Science, 98(2), 1145-1156.

Bueno I, Brandi RA, Fagundes GM, Benetel G, Muir JP. 2020. The role of condensed tannins in the in vitro rumen fermentation kinetics in ruminant species: ¿feeding type involved? Animals. 10(4):635.

Buffa G, Mangia NP, Cesarani A, Licastro D, Sorbolini S, Pulina G, Nudda A. 2020b. Agroindustrial by-products from tomato, grape and myrtle given at low dosage to lactating dairy ewes: effects on rumen parameters and microbiota. Ital. J. Anim. Sci. 19:1462–1471.

Buffa G, Tsiplakou E, Mitsiopoulou C, Pulina G, Nudda A. 2020a. Supplementation of by-products from grape, tomato and myrtle affects antioxidant status of dairy ewes and milk fatty acid profile. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 104:493–506.

Caetano M, Wilkes M J, Pitchford W S, Lee S J, Hynd P I. 2019. Effect of ensiled crimped grape marc on energy intake, performance and gas emissions of beef cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 247:166-172.

Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, García-Barroso C. 2018. Effect of drying on the phenolic content and antioxidant activity of red grape pomace. Plant Foods Hum Nutr. 73(1):74-81.

Carrasco Beghelli, C. E. 2014. Estudio de la uva variedad país y su potencial enológico y vitícola. Tesis Universidad de Chile.

Castellanos-Gallo, L.; Ballinas-Casarrubias, L.; Espinoza-Hicks, J.C.; Hernández-Ochoa, L.R.; Muñoz-Castellanos, L.N.; Zermeño-Ortega, M.R.; Borrego-Loya, A.; Salas, E. 2022. Grape Pomace Valorization by Extraction of Phenolic Polymeric Pigments: A Review. Processes. 10:469.

Cerda Moraga CB. 2014. Caracterización polifenólica de orujos y escobajos de uva carménère provenientes de diferentes localidades vitivinícolas de Chile. Tesis Universidad de Chile.

Chedea VS, Pelmus RS, Lazar C, Pistol GC, Calin LG, Toma SM, Taranu, I. 2017. Effects of a diet containing dried grape pomace on blood metabolites and milk composition of dairy cows. J. Sci. Food Agric. 97(8):2516-2523.

Chen L, Bao X, Guo G, Huo W, Xu Q, Wang C, Li Q, Liu Q. 2021. Effects of Hydrolysable Tannin with or without Condensed Tannin on Alfalfa Silage Fermentation Characteristics and In Vitro Ruminal Methane Production, Fermentation Patterns, and Microbiota. Animals. 11(7):1967.

Chen S, Arrouays D, Angers DA, Martin MP, Walter, C. 2019. Soil carbon stocks under different land uses and the applicability of the soil carbon saturation concept. Soil Tillage Res. 188, 53–58.

Chew KW, Chia SR, Lee SY, Zhu L, Show PL. 2019. Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. Chemical Engineering Journal. 367:1–8.

Chikwanha OC, Raffrenato E, Muchenje V, Musarurwa HT, Mapiye C. 2018. Varietal differences in nutrient, amino acid and mineral composition and in vitro rumen digestibility of grape (Vitis vinifera) pomace from the Cape Winelands vineyards in South Africa and impact of preservation techniques. Ind Crops Prod. 118:30-37.

Chikwanha OC, Muchenje V, Nolte JE, Dugan MER, Mapiye C. 2019. Grape pomace (Vitis vinifera L. cv. Pinotage) supplementation in lamb diets: Effects on growth performance, carcass and meat quality. Meat Sci. 147, 6–12.

Christ KL, Burritt RL. 2013. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. J Clean Prod. 53:232–242.

Cieślak A, Váradyová Z, Kišidayová S, Jalč D, Szumacher-Strabel M. 2013. Effect of diets with fruit oils supplements on rumen fermentation parameters, fatty acid composition and methane production in vitro. Journal of Animal and Feed Sciences. 22(1):26-34.

Cieslak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E, Szumacher-Strabel, M. 2012. Effects of tannins source (Vaccinium vitis idaea L.) on rumen microbial fermentation in vivo. Animal feed science and technology, 176(1-4), 102-106.

Çoklar H, Akbulut M. 2017.Effect of sun, oven and freeze-drying on anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant activity of black grape (Ekşikara) (Vitis vinifera L.). South African J. Enol. Vitic. 38(2):264-272.

Correddu F, Lunesu MF, Buffa G, Atzori AS, Nudda A, Battacone G, Pulina G. 2020. Can Agro-Industrial By-Products Rich in Polyphenols be Advantageously Used in the Feeding and Nutrition of Dairy Small Ruminants? Animals (Basel). 14;10(1):131.

Correddu F, Nudda A, Battacone G, Boe R, Francesconi AHD, Pulina G. 2014. Effects of grape seed supplementation, alone or associated withlinseed, on ruminal metabolism in Sarda dairy sheep. Anim Feed SciTechnol199:61–72.

Costa M, Alves SP, Cappucci A, Cook SR, Duarte A, Caldeira RM, Bessa RJ. 2018. Effects of condensed and hydrolyzable tannins on rumen metabolism with emphasis on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(13), 3367-3377

Da Porto C, Natolino A. 2018. Optimization of the extraction of phenolic compounds from red grape marc (Vitis vinifera L.) using response surface methodology. J Wine Res 29:26–36.

Dávila I, Robles E, Egüés I, Labidi J, Gullón P. 2017. The biorefinery concept for the industrial valorization of grape processing by-products. In Handbook of Grape Processing By-Products—Suitable Solutions; Galanakis, C.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 29–53. ISBN 9780128098707.

Dehority BA. 1991. Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. Proceedings of the Nutrition Society. 50(2), 149-159.

Demirtas A, Musa SA, Salgirli-Demirbas Y, Ozturk H, Pekcan M, Toprak NN. Emre MB. 2021. The effects of Pinus brutia bark extract on pure and mixed continuous cultures of rumen bacteria and archaea, and fermentation characteristics in vitro. Veterinarski Arhiv. 91(5):523-536.

Denman SE, McSweeney CS. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol Ecol, 58, pp. 572-582.

Desrues O, Mueller-Harvey I, Pellikaan WF, Enemark HL, Thamsborg SM. 2017. Condensed tannins in the gastrointestinal tract of cattle after sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) intake and their possible relationship with anthelmintic effects. J. Agric. Food Chem. 65:1420–1427.

Devesa-Rey R, Vecino X, Varela-Alende JL, Barral MT, Cruz JM, Moldes AB. 2011. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. J. Waste Manag. 31:2327–2335.

Dewanckele L, Jeyanathan J, Vlaeminck B, Fievez V. 2020. Identifying and exploring biohydrogenating rumen bacteria with emphasis on pathways including trans-10 intermediates. BMC Microbiology, 20(1):1-21

Dhanasekaran DK, Dias-Silva TP, Sakita GZ, Abdalla AL, Louvandini H, Elghandour MM. 2020. Plants extract and bioactive compounds on rumen methanogenesis. Agroforestry Systems. 94(4):1541-1553

Díaz-Carrasco JM, Cabral C, Redondo LM, Pin Viso ND, Colombatto D, Farber MD, Fernández Miyakawa ME. 2017. Impact of Chestnut and Quebracho Tannins on Rumen Microbiota of Bovines. Biomed Res Int. 9610810.

Drevelegka I, Goula, AM. 2020. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. Chemical Engineering and Processing-Process Intensification. 149:107845.

Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. 2015. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. Industrial Crops and Products. 75(B):141-149.

Ebeid HM, Mengwei L, Kholif AE, Hassan FU, Lijuan P, Xin L, Chengjian Y. 2020. Moringa oleifera oil modulates rumen microflora to mediate in vitro fermentation kinetics and methanogenesis in total mix rations. Current microbiology. 77(7):1271-1282.

Eleonora N, Dobrei A, Alina D, Bampidis V, Valeria C. 2014. Grape pomace in sheep and dairy cows feeding. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 18(2), 146-150.

Embaby MG, Günal M, AbuGhazaleh A. 2019. Effect of unconventional oils on in vitro rumen methane production and fermentation. Cienc. Investig. Agrar. 46(3):276-285

Eriz G, Sanhueza V, Roeckel M, Fernández K. 2011. Inhibition of the Angiotensin-Converting Enzyme by Grape Seed and Skin Proanthocyanidins Extracted from Vitis vinífera L. Cv. País. LWT Food Sci. Technol. 44, 860–865.

Esquivel-Hernández DA, Rodríguez-Rodríguez J, Rostro-Alanis M, Cuéllar- Bermúdez SP, Mancera-Andrade EI, Nuñez-Echeverria J, García-Pérez JS, Chandra R, Parra-Saldivar R. 2017. Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from Arthrospira Platensis and bioactivity evaluation. Bioresour. Technol. 224, 618–629.

Famuyiwa OO, Ough CS. 1990. Effect of structural constituents of cell wall on the digestibility of grape pomace. J. Agric. Food Chem. 38:966–968.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia). 2017. The future of food and agriculture: trends and challenges (en línea). Roma, Italia. 180 p. Consultado 10 dic 2021. Disponible en http://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf.

Fedorah PM, Hrudey SE. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic culture in serum bottles. Environ. Technol. Lett. 4:425– 432.

Ferreira G, Mertens DR. 2005. Chemical and Physical Characteristics of Corn Silages and Their Effects on In Vitro Disappearance. J. Dair Sci. 88(12):4414-4425.

Figueroa T, Aguayo C, Fernández K. 2020. Design and characterization of chitosan-graphene oxide nanocomposites for the delivery of proanthocyanidins. Int J Nanomedicine. 20(15):1229-1238.

Fitri A, Obitsu T, Sugino T. 2021. Effect of ensiling persimmon peel and grape pomace as tannin-rich byproduct feeds on their chemical composition and in vitro rumen fermentation. Anim. Sci. J. 92(1),e13524.

Flores D RM, da Fonseca AFP, Schmitt J, Tonetto C J, Junior AGR, Hammerschmitt RK, Nörnberg JL. 2021. Lambs fed with increasing levels of grape pomace silage: Effects on meat quality. Small Ruminant Research, 195, 106234.

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. Anim. Sci. J. 87:370–377.

Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K. Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci., 368:1621.

Fraga-Corral M, Otero P, Echave J, Garcia-Oliveira P, Carpena M, Jarboui A, Nuñez-Estevez B, Simal-Gandara J, Prieto MA. 2021. By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins' biological activities and their potential for valorization. Foods. 10(1):137.

Friedman, M. 2014. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. J Agric Food Chem 62:6025–6042.

Fuleki T, Ricardo-da-Silva JM. 2003. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. J. Agric. Food Chem. 51(3):640–646 .

Galanakis CM, Markouli E, Gekas V. 2013. Recovery and fractionation of diferent phenolic classes from winery sludge using ultra filtration. Separat Purif Technol 107:245–251

García-Lomillo J, González-SanJosé ML. 2017. Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 16, 3–22.

García-Rodríguez J, Ranilla MJ, France J, Alaiz-Moretón H, Carro MD, López S. 2019. Chemical Composition, In vitro digestibility and rumen fermentation kinetics of agro-industrial by-products. Animals. 9 11:861.

Garrido T, Gizdavic-Nikolaidis M, Leceta I, Urdanpilleta M, Guerrero P, de la Caba K, Kilmartin PA. 2019. Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc using microwave-assisted extraction. Waste Management. 88:110-117

Gaughan J B, Sejian V, Mader T L, Dunshea FR. 2019. Adaptation strategies: ruminants. Anim. Front. 9:47–53.

Gessner DK, Koch C, Romberg FJ, Winkler A, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder, K. 2015. The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation. Journal of Dairy Science. 98:8856– 8868.

Gessner DK, Ringseis R, Siebers M, Keller J, Kloster J, Wen G, Eder K. 2012. Inhibition of the pro-inflammatory NF-κB pathway by a grape seed and grape marc meal extract in intestinal epithelial cells. J. Anim. Physiol. Anim. Nutrit. 96: 1074-108.

Gessner DK, Ringseis R, Eder K. 2017. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. J Anim Physiol Anim Nutr, 101: 605-628

Getachew G, Makkar HPS, Becker K. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. Br. J. Nutr. 84, 73-83.

Ghendov-Mosanu A, Cojocari D, Balan G, Patras A, Lung I, Soran ML, Sturza R. 2022. Chemometric Optimization of Biologically Active Compounds Extraction from Grape Marc: Composition and Antimicrobial Activity. Molecules. 27(5):1610.

Giller K, Bossut L, Eggerschwiler L, Terranova M. 2021. In vitro ruminal fermentation, methane production and nutrient degradability as affected by fruit and vegetable pomaces in differing concentrations. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).

Girard M, Dohme-Meier SA, Kragten AG, Brinkhaus Y, Arrigo U, Wyss, G. Bee. 2018. Modification of the proportion of extractable and bound condensed tannins in birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus) and sainfoin (Onobrychis viciifolia) during wilting, ensiling and pelleting processes. Biotechnol. Anim. Husb. 34:1–19.

Godoy S, Roeckel M, Fernández K. 2012. Influence of the structure and composition of the País grape proanthocyanidins on the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE). Food Chem 134:346–350.

Göktürk-Baydar N, Özkan G, Sema Çetin E. 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. Grasas y Aceites. 58(1):29–33.

Gómez-Brandon, M., Lores, M., Insam, H., Domínguez, J. 2019 Strategies for recycling and valorization of grape marc, Critical Reviews in Biotechnology, 39:4, 437-450

Gómez-Cortés P, Guerra-Rivas C, Gallardo B, Lavín P, Mantecón AR, de la Fuente MA, Manso T. 2018. Grape pomace in ewes diet: Effects on meat quality and the fatty acid profile of their suckling lambs. Food Res Int. Nov; 113:36-42.

Gómez-Cortés P, Guerra-Rivas C, Gallardo B, Lavín P, Mantecón AR, De la Fuente MA, Manso T. 2018. Grape pomace in ewes diet: Effects on meat quality and the fatty acid profile of their suckling lambs. Food Research International, 113, 36-42.

Goula AM, Thymiatis K, Kaderides K. 2016. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics, Food and Bioproducts Processing. 100 (A):132-144.

Gowman A, Wang T, Rodriguez-Uribe A, Mohanty AK, Misra M. 2018. Bio-poly (butylene succinate) and its composites with grape pomace: mechanical performance and thermal properties. ACS Omega 3, 15205–15216.

Granda H, de Pascual-Teresa S. 2018. Polyphenols interactions with other food components as a mean for their neurological health benefits. J. Agric. Food Chem. 66:8224–8230

Greenwood SL, Edwards GR, Harrison R. 2012. Short Communication: Supplementing grape marc to cows fed a pasture-based diet as a method to alter nitrogen partitioning and excretion. J. Dairy Sci. 95:755–758.

Guaita M, Bosso A. 2019. Polyphenolic characterization of grape skins and seeds of four Italian red cultivars at harvest and after fermentative maceration. Foods. 8(9):395.

Guaita M, Panero L, Motta S, Mangione B, Bosso A. 2021. Effects of high-temperature drying on the polyphenolic composition of skins and seeds from red grape pomace. LWT. 145:111323

Guendez R, Kallithraka S, Makris D, Kefalas P. 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis vinifera sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. Food Chem. 89(1):1-9.

Guerra-Rivas C, Gallardo B, Mantecón ÁR, del Álamo-Sanza M, Manso T. 2017. Evaluation of grape pomace from red wine by-product as feed for sheep. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(6), 1885-1893.

Gutiérrez-Gamboa G, Liu SY, Pszczólkowski P. 2020. Resurgence of minority and autochthonous grapevine varieties in South America: a review of their oenological potential. J. Sci. Food Agric.100(2), 465-482.

Hagerman AE. 2012. Fifty years of polyphenol-protein complexes. p.71-97. In: Recent advances in polyphenol research. vol. 3. 3rd ed. Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P. and Quideau, eds. John Wiley & Sons, Ltd., Oxford, UK.

Halmemies-Beauchet-Filleau A, Rinne M, Lamminen M, Mapato C, Ampapon T, Wanapat M, Vanhatalo A. 2018. Review: Alternative and novel feeds for ruminants: Nutritive value, product quality and environmental aspects. Animal. 12: S295-S309

Hammi KM, Jdey A, Abdelly C, Majdoub H, Ksouri R. 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus lotus fruits using response surface methodology. Food Chem. 184:80–89.

Hanušovský O, Gálik B, Bíro D, Šimko M, Juráček M, Rolinec M, Zábranský L, Philipp C, Puntigam R, Slama JA, Gierus M. 2020. The Nutritional Potential of Grape By-Products from the Area of Slovakia and Austria. Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol. 32(1):1-10

Haque, M. 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. J. Anim. Sci. Technol. 60, 15.

Hassan FU, Arshad MA, Ebeid HM, Rehman MSU, Khan MS, Shahid S, Yang C. 2020. Phytogenic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation

kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. Frontiers. 7, 575801.

Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS. 2019. Grape pomace as a promising antimicrobial alternative in feed: A critical review. Journal of agricultural and food chemistry. 67(35):9705-9718

Hassanat F, Benchaar C. 2013. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. J. Sci. Food Agric. 9:332-9.

Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, and Janssen PH. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Sci. Rep. 5:14567.

Hess M, Paul SS, Puniya AK, van der Giezen M, Shaw C, Edwards JE, Fliegerová K. 2020. Anaerobic Fungi: Past, Present, and Future. Front Microbiol. 2020 Oct 2;11:584893.

Hixson J L, Durmic Z, Vadhanabhuti J, Vercoe P E, Smith P A, Wilkes E N. 2018. Exploiting Compositionally Similar Grape Marc Samples to Achieve Gradients of Condensed Tannin and Fatty Acids for Modulating In Vitro Methanogenesis. Molecules. 23:1793.

Hixson J L, Jacobs J L, Wilkes E N. 2016. Smith, P.A. Survey of the variation in grape marc condensed tannin composition and concentration and analysis of key compositional factors. J. Agric. Food Chem. 64:7076–7086.

Hoste H, Meza-Ocampos G, Marchand S, Sotiraki S, Sarasti K, Blomstrand BM, Morgan ER. 2022. Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. Parasite. 29.

Hristov AN, Hanigan M, Cole A, Todd R, McAllister TA, Ndegwa PM, Rotz A. 2011. Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. Canadian Journal of Animal Science. 91(1):1-35.

Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HPS, Adesogan AT, Yang W, Lee C. 2013. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. J. Anim. Sci. 91:5045–5069.

Huang Y, Oikonomou G, Hu J, Li Y, Du X, Du Y, He B. 2019. Effect of feeding grape seed Proanthocyanidin extract on production performance, metabolic and anti-

oxidative status of dairy cattle. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 71:1207-1216

Hur SJ, Kim HS, Bahk YY, Park Y. 2017. Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. Livest. Sci. 195:105–111.

Huyen NT, Fryganas C, Uittenbogaard G, Mueller-Harvey I, Verstegen MWA, Hendriks WH Pellikaan WF. 2016. Structural features of condensed tannins affect in vitro ruminal methane production and fermentation characteristics. J. Agric. Sci. 154:1474–1487.

Ianni A, di Maio G, Pittia P, Grotta L, Perpetuini G, Tofalo R, Cichelli A, Martino G. 2019. Chemical–nutritional quality and oxidative stability of milk and dairy products obtained from Friesian cows fed with a dietary supplementation of dried grape pomace. J. Sci. Food Agric. 99(7):3635-3643.

Ianni A, Martino G. 2020. Dietary Grape Pomace Supplementation in Dairy Cows: Effect on Nutritional Quality of Milk and Its Derived Dairy Products. Foods. 9:168.

Ibrahim NA I, 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

Ibrahim NA, Alimon AR, Yaakub H, Samsudin AA, Candyrine SCL, Wan Mohamed WN, Mookiah S. 2021. Effects of vegetable oil supplementation on rumen fermentation and microbial population in ruminant: a review. Trop. Anim. Health Prod. 53(4):1-11.

Ide W, Sabando C, Castaño J, Pettinelli N, Bustos R, Linares A, Mora L, Müller, N, Pascual G, Rodríguez-Llamazares S. 2021. Grape (*Vitis vinifera* L. cv. País) juices obtained by steam extraction. Processes. 9(9):1670.

International Organization of Vine and Wine. 2021. State of the world vitivinicultural sector in 2020. April 2021. https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf

Iora SR, Maciel GM, Zielinski AA, da Silva MV, Pontes PVDA, Haminiuk CW, Granato D. 2015. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. International Journal of Food Science & Technology. 50(1):62-69.

IPCC. 2014. Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.

Ishida K, Kishi Y, Oishi K, Hirooka H, Kumagai H. 2015. Effects of feeding polyphenol-rich winery wastes on digestibility, nitrogen utilization, ruminal fermentation, antioxidant status and oxidative stress in wethers. Anim. Sci. J. 86:260-9.

Ivan M, Petit H, Chiquette J, Wright, A. 2013. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. British J. Nut. 109(7):1211-1218.

Ivanišová E, Terentjeva M, Kántor A, Francˇáková H, Kacˇániová, M. 2019. Phytochemical and antioxidant profile of different varieties of grape from the Small Carpathians wine region of Slovakia. Erwerbs. Obstbau. 61:53–59.

Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane forma- tion and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. Anim Feed Sci Technol. 160:1-22.

Jara-Palacios MJ, González-Manzano S, Escudero-Gilete M, Hernanz D, Dueñas M, González-Paramás AM, Heredia FJ, Santos-Buelga C. 2013. Study of zalema grape pomace: phenolic composition and biological effects in *Caenorhabditis elegans*. J. Agric. Food Chem. 61(21):5114-5121.

Jayanegara A, Ridla M, Laconi EB and Nahrowi N. 2018 Tannin as a feed additive for mitigating enteric methane emission from livestock: meta-analysis from RUSITEC experiments IOP Conf.Ser.: Mater. Sci. Eng. 434 012108.

Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 76:3851-3863.

Jia MZ, Fu X Q, Deng L, Li Z L, Dang YY. 2021. Phenolic extraction from grape (Vitis vinifera) seed via enzyme and microwave co-assisted salting-out extraction. Food Biosc. 40:100919.

Jin Q, O'Hair J, Stewart, AC, O'Keefe SF, Neilson AP, Kim YT, McGuire M, Lee A, Wilder G, Huang H. 2019. Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. Foods.8(12):667.

Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73, 2483–2492.

Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, Bugarski BM. 2017. Optimization of the extraction process of polyphenols from

Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. Separation and Purification Tech. 179:369-380.

Juráček M, Vašeková P, Massányi P, Kováčik A, Bíro D, Šimko M, Gálik B, Rolinec M, Hanušovský O, Kolláthová R, Mixtajová E, Kalúzová M. 2021. The Effect of Dried Grape Pomace Feeding on Nutrients Digestibility and Serum Biochemical Profile of Wethers. Agriculture. 11(12):1194.

Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Makri S, Stagos D, Gerasopoulos K, Petrotos K, Goulas P, Kouretas D. 2018. Effects of Dietary Grape Pomace Supplementation on Performance, Carcass Traits and Meat Quality of Lambs. In vivo. 32(4), 807–812.

Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti, E. 2018. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. Bioresources and Bioprocessing. 5(1), 1-21.

Kasapidou E, Sossidou E, Mitlianga P. 2015. Fruit and Vegetable Co-Products as Functional Feed Ingredients in Farm Animal Nutrition for Improved Product Quality. Agriculture. 5(4):1020-1034.

Kim SW, Less JF, Wang L, Yan T, Kiron V, Kaushik SJ, Lei, X.G. 2019. Meeting Global Feed Protein Demand: Challenge, Opportunity, and Strategy. Annu. Rev. Anim. Biosci. 7:221–243.

Kingston-Smith AH, Edwards JE, Huws SA, Kim EJ, Abberton M. 2010. Plant-based strategies towards minimizing 'livestock's long shadow'. Proc. Nutr. Soc. 69:613–620.

Klein O, Nier S Tamásy C. 2022. Towards a Circular Bioeconomy? Pathways and Spatialities of Agri-Food Waste Valorisation. Tijds. voor econ. Soc. Geog. 113(2):194-210.

Koike S, Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen bacteria: *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens.* FEMS Microbiol Lett 13: 361–366.

Kolláthová R, Hanušovský O, Gálik B, Bíro D, Šimko M, Juráček M, Gierus, M. 2020. Fatty acid profile analysis of grape by-products from Slovakia and Austria. Acta Fytotech. Zootech, 23(2), 50.

Komarek AM, Dunston S, Enahoro D, Godfray HCJ, Herrero M, Mason-D'Croz D, Rich

KM, Scarborough P, Springmann M, Sulser TB, Wiebe K. 2021. Income, consumer preferences, and the future of livestock-derived food demand. Glob Environ Chan 70:102343.

Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre PL. 2014. Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. Molecules 19, 482–506.

Lamy E, Pinheiro C, Rodrigues L, Capela e Silva F, Lopes OS, Tavares S. (2016). Determinants of Tannin-Rich Food and Beverage Consumption: Oral Perception vs. Psychosocial Aspects. In: Combs CA (ed). Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties. Nova Science Publishers Inc: New York, USA.

Lan W, Yang C. 2019. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. Sci. Total Envir. 654: 1270-1283.

Lavrenčič A, Levart A. 2021. *In vitro* dry matter and crude protein rumen degradation and abomasal digestibility of soybean meal treated with chestnut and quebracho wood extracts. Food Sci Nutr. 9: 1034– 1039.

Lavrenčič A, Stefanon B, Susmel P. 1997. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. J Anim Sci. 64:423–431.

Liang YS, Li GZ, Li XY, Lü JY, Li FD, Tang DF, Li F, Deng Y, Zhang H, X Wang DF, Weng XX. 2017. Growth performance, rumen fermentation, bacteria composition, and gene expressions involved in intracellular pH regulation of rumen epithelium in finishing Hu lambs differing in residual feed intake phenotype. J. Anim. Sci. 95(4): 1727–1738.

Lima PR, Apdini T, Freire AS, Santana AS, Moura LML, Nascimento JCS, Menezes DR. 2019. Dietary supplementation with tannin and soybean oil on intake, digestibility, feeding behavior, ruminal protozoa and methane emission in sheep. Anim. Feed Sci. Tech. 249:10-17.

Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV. 2016. From grape to wine: changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. Food Chem. 208:228–238.

Liu J, Ma K, Ciais P, Polasky S. 2016. Reducing human nitrogen use for food production. Sci. Rep. 20104:1–14.

Lopes LD, Böger BR, Cavalli KF, dos S Silveira-Júnior JF, Osório DVCL, de Oliveira DF, Luchetta L, Tonial IB. 2014. Fatty acid profile, quality lipid index and bioactive compounds of flour from grape residues. Cien. Inv. Agr. 41:225-234.

Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. 2013. Evolution of Analysis of Polyhenols from Grapes, Wines, and Extracts. Molecules. 18:1076-1100.

Lourenco JM, DiLorenzo N, Stelzleni AM, Segers JR, Stewart RL. 2016. Use of by-product feeds to decrease feed cost while maintaining performance of developing beef bulls. Prof Anim Sci. 32(3):287–294

Lutterodt H, Slavin M, Whent M, Turner E, Yu LL. 2011. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. Food Chem. 128(2):391–399.

Lutz M, Cajas Y, Henríquez C. 2012. Contenido de fenoles y capacidad antioxidante en uvas chilenas cv. País y Cabernet Sauvignon. CyTA. Journal of food, 10:4:251-257.

Maia MR, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Wallace RJ. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, Butyrivibrio fibrisolvens. BMC microbiology. 10(1):1-10.

Maier T, Schieder A, Kammerer DR. 2009. Residues of grape (Vitis vinifera L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. Food Chem. 112: 551–559.

Makkar HPS. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategiesto overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research. 49:241–256.

Manso T, Gallardo B, Salvá A, Guerra-Rivas C, Mantecón AR, Lavín P, de la Fuente MA. 2016. Influence of dietary grape pomace combined with linseed oil on fatty acid profile and milk composition. J. Dairy Sci. 99:1111–1120.

Mapiye C, Vahmani P, Mlambo V, Muchenje V, Dzama K, Hoffman LC, Dugan MER. 2015. The trans-octadecenoic fatty acid profile of beef: Implications for global food and nutrition security. Food Research International.76(4):992-1000.

Marchiani R, Bertolino M, Ghirardello D, McSweeney PL, Zeppa G 2016. Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheeses. J Food Sci Technol 53(3):585–1596.

Martínez-Meza Y, Pérez-Jiménez J, Castaño-Tostado E, Pérez-Ramírez IF, Alonzo-Macías M, Reynoso-Camacho R. 2021. Instant controlled pressure drop as a strategy to modify extractable and non-extractable phenolic compounds: A study in different grape pomace materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70(23), 6911-6921.

Massaro Junior FL, Bumbieris Junior VH, Pereira E S, Zanin E, Horst EH, Calixto OPP, Mizubuti IY. 2021. Grape pomace silage on growth performance, carcass, and meat quality attributes of lambs. Scientia Agricola, 79.

Mateos I, Ranilla MJ, Saro, Carro MD. 2017. Shifts in microbial populations in Rusitec fermenters as affected by the type of diet and impact of the method for estimating microbial growth (15N v. microbial DNA). Animal. 111939–1948.

Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H & Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human faeces. Appl Environ Microb 68: 5445–5451.

McDougall EI. 1948. Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43:99–109.

Menci R, Coppa M, Torrent A, Natalello A, Valenti B, Luciano G, Priolo A, Niderkorn V. 2021. Effects of two tannin extracts at different doses in interaction with a green or dry forage substrate on in vitro rumen fermentation and biohydrogenation. Anim. Feed Sci. Tech. 278:1–13.

Menke K H, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. 93:217–222.

Menke KH, Stengass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:7–55.

Mertens DR. 2002. Gravimetric determination of amylase- treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. Journal of AOAC International. 85:1217–1240.

Milinčić DD, Kostic AŽ, Špirovic´-Trifunovic´ BD, Tešic´ ŽL, Tosti TB, Dramic´anin AM, Barac´ MB, Pešic´ MB. 2020. Grape seed flour of different grape pomaces: Fatty acid profile, soluble sugar profile and nutritional value. J. Serb. Chem. Soc. 85:305–319.

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 tannins mitigation options. Anim. Nutr. 6:231–246.

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.

Mirzaei-Alamouti H, Abdollahi A, Rahimi H, Moradi S, Vazirigohar M, Aschenbach JR. 2021. Effects of dietary oil sources (sunflower and fish) on fermentation characteristics, epithelial gene expression and microbial community in the rumen of lambs fed a high-concentrate diet. Arch Anim Nutr. 75(6):405-421.

Moate P J, Jacobs J L, Hixson J L, Deighton M H, Hannah M C, Morris G L, Ribaux B E, Wales WJ, Williams S R O. 2020. Effects of Feeding either Red or White Grape Marc on Milk Production and Methane Emissions from Early-Lactation Dairy Cows. Animals. 10:976.

Moate P J, Williams S R O, Torok V A, Hannah M C, Ribaux B E, Tavendale M H, Eckard R J, Jacobs J L, Auldist M J, Wales W J. 2014. Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. J. Dairy Sci. 97:5073-5087.

Moate PJ, Williams SRO, Grainger C, Hannah MC, Ponnampalam EN, Eckard RJ. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 166:254–264.

Mohamed-Ahmed, I. A., Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Babiker, E. F. E., Ghafoor, K., Banjanin, T., Alqah, H. A. 2020. Chemical composition, bioactive compounds, mineral contents, and fatty acid composition of pomace powder of different grape varieties. Journal of Food Processing and Preservation, 44(7):e14539.

Molina-Alcaide E, Moumen A, Martín-García AI. 2008. By-products from viticulture and the wine industry: Potential as sources of nutrients for ruminants. J. Sci. Food Agric. 88:597–604.

Molosse VL, Deolindo GL, Cécere BG, Marcon H, da Rosa G, Vedovatto M, Zotti CA, Silva AD, Fracasso M, Morsch VM, Carvalho RA, Pereira WAB, Da Silva AS. 2021. Effect of dietary supplementation with grape residue flour on weight gain, metabolic profile, leukogram, proteinogram and antioxidant response in suckling lambs. Res Vet Sci. 139:112-120.

Moorby JM, Fraser MD. 2021. Review: New feeds and new feeding systems in intensive and semi-intensive forage-fed ruminant livestock systems. Animal 15.100297:1-9.

Moore KJ, Jung HG. 2001. Lignin and fiber digestion. J. range manage. 54(4): 420-430.

Moreira MM, Barroso MF, Porto JV, Ramalhosa MJ, Švarc-Gajic´ J, Estevinho L, Morais S, Delerue-Matos C, 2018. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. Sci. Total Environ. 634:831–842.

Mottet A, de Haan C, Falcucci A, Tempio G, Opio C, Gerber P. 2017. Livestock: on our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. Glob. Food Sec. 14, 1–8.

Mousa SA, Malik PK, Kolte AP, Bhatta R, Kasuga S, Uyeno, Y. 2019. Evaluation of in vitro ruminal fermentation of ensiled fruit byproducts and their potential for feed use. Asian-Australasian journal of animal sciences, 32(1), 103.

Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill JR, Monfreda C, Polasky S, Rockström J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D, Zaks DPM. 2011. Solutions for a cultivated planet. Nature 478, 337–342.

Muhlack RA, Potumarthi R, Jeffery DW. 2018. Sustainable wineries through waste valorisation: A review ofgrape marc utilisation for value-added products. Waste Manag. 72, 99–118.

Nacional CV. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Santiago, Chile. 2019. Disponible online: http://www.sag.gob.cl (revisado el 20 noviembre 2021).

Nacional, C.V. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Santiago, Chile. 2021. Disponible online: http://www.sag.gob.cl (revisado el 10 enero 2022).

Natolino A, Da Porto C. 2020. Kinetic models for conventional and ultrasound assistant extraction of polyphenols from defatted fresh and distilled grape marc and its main components skins and seeds. Chemical Engineering Research and Design. 156:1-12.

Naumann HD, Tedeschi LO, Zeller WE, Huntley NF. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: Advances, limitations and future directions. Rev. Bras. Zootec. 46:929–949.

Newbold CJ, López S, Nelson N, Ouda J, Wallace RJ, Moss A. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron

acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. Br. J. Nutr. 94, 27–35.

Newbold CJ, de La Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. Front. Microbiol. 6:1313.

Nudda A, Buffa G, Atzori AS, Cappai MG, Caboni P, Fais G, Pulina G. 2019. Small amounts of agro-industrial byproducts in dairy ewes diets affects milk production traits and hematological parameters. Anim. Feed Sci. Tech. 251:76-85.

Odepa. 2019. Boletín del vino. Enero de 2019. Disponible en: https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/01/Bvino012019.pdfRevisado en mayo de 2019

O'Donnell CP, Tiwari BK, Bourke P, Cullen PJ. 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. Trends Food Sci Technol. 21:358-367.

OECD/FAO. 2021. OECD-FAO agricultural outlook 2021–2030. Disponible en: https://www.fao.org/publications/oecd-fao-agricultural-outlook/2021-2030/en/. Revisado en mayo de 2021

Oskoueian E, Abdullah N, Oskoueian A. 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. BioMed Res. Int. 2013:349129.

Ozkan K, Karadag A, Sagdic O. 2022. The effects of different drying methods on the in vitro bioaccessibility of phenolics, antioxidant capacity, minerals and morphology of black 'Isabel' grape. LWT-Food Sci. Technol. 158:11318.

Papoutsis K, Pristijono P, Golding JB, Stathopoulos CE, Bowyer MC, Scarlett CJ, Vuong QV, 2017. Effect of vacuum-drying, hot air-drying and freeze- drying on polyphenols and antioxidant capacity of lemon (Citrus limon) pomace aqueous extracts. Int. J. Food Sci. Technol. 52, 880–887.

Patra AK, Saxena J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutri- tion. J. Sci. Food Agric. 91:24–37.

Payne MJ, Hurst WJ, Stuart DA, Ou B, Fan E, Ji H, Kou Y. 2010. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. J AOAC Int. 93(1):89-96.

Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhelha RC, Barros L, Pinho SP, Ferreira IC. 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. Food Chem. 253:132-138.

Pellikaan WF, Stringano E, Leenaars J, Bongers DJGM, Schuppen S, van L. van, Plant J, Mueller-Harvey I. 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CHN_- production using an automated pressure evaluation system (APES). Anim. Feed Sci. Technol. 166–167:377–390.

Perna-Junior F, Nogueira RGS, Ferreira Carvalho R, Cassiano ECO, Rodrigues PHM. 2022. Use of tannin extract as a strategy to reduce methane in Nellore and Holstein cattle and its effect on intake, digestibility, microbial efficiency and ruminal fermentation. J. Anim. Physiol. Anim. Nut. 1– 14.

Pickering NK, Oddy VH, Basarab J, Cammack K, Hayes B, Hegarty RS, Lassen J, McEwan JC, Miller S, Pinares-Patiño CS. 2015. Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. Animal. 9(9):1431–144.

Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends Food Sci. Tech. 17: 579–590.

Piñeiro-Vázquez AT, Jiménez-Ferrer G, Alayon-Gamboa JA, Chay-Canul AJ, Ayala-Burgos A J, Aguilar-Pérez, CF, Ku-Vera JC. 2018. Effects of quebracho tannin extract on intake, digestibility, rumen fermentation, and methane production in crossbred heifers fed low-quality tropical grass. Tropical Animal Health and Production, 50, 29-36.

Pires JA, Gomes WPC, Teixeira NN, Melchert WR. 2021. Effect of drying methods on nutritional constitutes of fermented grape residue. J Food Sci Technol. 59:1-6.

Pirmohammadi R, Hamidi O, Azari AM, 2007. Effects of polyethylene glycol (PEG) addition on chemical composition, degradability and digestibility of white grape pomace. J Anim Vet Adv 6(9): 1135-1139.

Pop IM, Pascariu SM, Simeanu D, Radu-Rusu C, Albu A. 2015. Determination of the chemical composition of the grape pomace of different varieties of grapes. Scientific Papers-Animal Science Series: Lucraritiinifice-Seria Zootehnie. 63:76-80.

Portuondo Y, Portuondo J. 2010. La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. Tecnología Química. XXX (2):117-121.

Purba RAP, Paengkoum P, Paengkoum S. 2020. The links between supplementary tannin levels and conjugated linoleic acid (CLA) formation in ruminants: A systematic review and meta-analysis. PLoS One, 15(3), e0216187.

Rainero G, Bianchi F, Rizzi C, Cervini M, Giuberti G, Simonato B. 2021. Breadsticks fortification with red grape pomace: Effect on nutritional, technological, and sensory properties. J. Sci. Food Agric. 102(6):2545-2552.

Ran Y, Van Middelaar CE, Lannerstad M, Herrero M, De Boer IJM. 2016. Freshwater use in livestock production: to be used for food crops or livestock feed? Agric. Syst. 155, 1–8.

Ream CA, Stevens AV, Myers C, Chibisa GE. 2021. Effect of feeding ensiled or dried grape pomace on nitrogen utilization in backgrounding cattle. Translational Animal Science, 5(Supplement_S1): S120-S124.

Resconi VC, Pascual-Alonso M, Aguayo-Ulloa L, Miranda-de la Lama GC, Alierta S, Campo MM, Olleta JL, Villarroel M, María GA. 2018. Effect of dietary grape pomace and seed on ewe milk and meat quality of their suckling lambs. J. Food Qual. 1–8.

Rhine E, Mulvaney R, Pratt E, Sims G. 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. Soil Science Society of America Journal. 62(2):473-80.

Roca-Fernández AI, Dillard SL, Soder KJ. 2020. Ruminal fermentation and enteric methane production of legumes containing condensed tannins fed in continuous culture. J Dairy Sci. 103(8):7028-7038.

Rojas-Downing MM, Pouyan Nejadhashemi AP, Harrigan T, Woznicki SA. 2017. Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. Clim. Risk Manag. 16:145-163.

Rolinec M, Bíro D, Gálik B, Šimko M, Juráček M. 2021. Effect of Phytoadditives on Sow Reproductive Efficiency. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 1907–1914.

Rombaut N, Savoire R, Thomasset B, Castello J, Van Hecke E, Lanoiselle J.L. 2015. Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grapeseed cold screw pressing. Ind Crops Prod. 63:26–33.

Ropiak HM, Lachmann P, Ramsay A, Green RJ, Mueller-Harvey I. 2017. Identification of structural features of condensed tannins that affect protein aggregation. PloS one. 12(1): e0170768.

Rudnykh SI, López-Ríos VI. 2018. Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajo restricciones. Revista EIA, 15(30), 13-24.

Russo V M, Jacobs J L, Hannah M C, Moate P J, Dunshea F R, Leury BJ. 2017. In vitro evaluation of the methane mitigation potential of a range of grape marc products. Anim. Prod. Sci. 57:1437-1444.

Saha M, Gitto G, Dally BB. 2020. Burning characteristics of grape marc under mild combustion conditions. Experimental Thermal and Fluid Science. 114:110059–110069.

Salami SA, Luciano G, O′Grady MN, Biondi L, Newbold CJ, Kerry JP, and Priolo A. 2019. Sustainability of feeding plant by-products: a review of the implications for ruminant meat production. Anim. Feed Sci. Technol. 251:37–55.

Sales M, Lucas F, Blanchart, G. 2000. Effects of Ammonia and Amino Acids on the Growth and Proteolytic Activity of Three Species of Rumen Bacteria: *Prevotella albensis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, and *Streptococcus bovis*. Curr Microbiol 40:380–386.

Saminathan M, Sieo CC, Gan HM, Abdullah N, Wong CMVL, Ho YW. 2016. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights on population and diversity of bovine rumen methanogenic archaea in vitro, as determined by high-throughput sequencing. Anim. Feed Sci. Technol. 216:146–160.

Santos NW, Santos GTD, Silva-Kazama DC, Grande PA, Pintro PM, de Marchi FE, Jobim CC, Petit HV. 2014. Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. Livestock Science 159, 37–45.

Schofield P, Pitt RE, Pell AN. 1994. Kinetics of fibber digestion from in vitro gas production. J. Anim. Sci. 72:2980–299.

Schwab CG, Huhtanen P, Hunt CW, Hvelplund T. 2005. Nitrogen requirements of cattle, in Nitrogen and Phosphorous Nutrition of Cattle, eds Pfeffer, E., Hristov, A. N. Wallingford: CAB International.

Serra V, Salvatori G, Pastorelli G. 2021. Dietary Polyphenol Supplementation in Food Producing Animals: Effects on the Quality of Derived Products. Animals. 11-401:1-44.

Sharifi M, Bashtani M, Naserian AA, Farhangfar H, Emami A. 2018. The effect of grapeseed oil on performance, rumen fermentation, antioxidant status and subcutaneous adipose fatty acid profile in lambs. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 102(1):157-165.

Singleton VL, Rossi J A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16 (3):144-158.

Sinz S, Leparmarai PT, Liesegang A, Ortmann S, Kreuzer M, Marquardt S. 2021. Effects of dietary grapeseed extract on performance, energy and nitrogen balance as well as methane and nitrogen losses of lambs and goat kids. British J. Nutr. 125(1):26-37.

Sinz S, Liesegang A, Kreuzer M, Marquardt S. 2019b. Do supplements of Acacia mearnsii and grapeseed extracts alone or in combination alleviate metabolic nitrogen load and manure nitrogen emissions of lambs fed a high crude protein diet?. Archives of animal nutrition, 73(4), 306-323.

Sinz S, Marquardt S, Soliva CR, Braun U, Liesegang A, Kreuzer M. 2019a. Phenolic plant extracts are additive in their effects against in vitro ruminal methane and ammonia formation. Asian-Australas. j. animal sci. 32(7), 966.

Sirohi SK, Pandey P, Goel N, Mohini M, Kundu SS. 2021. Effect of tartaric acid addition on rumen fermentation, methane production and digestibility in different diets. OJAFR. 2:308-313.

Soldado D, Bessa RJB, Jerónimo E. 2021. Condensed tannins as antioxidants in ruminants—effectiveness and action mechanisms to improve animal antioxidant status and oxidative stability of products. Animals. 11:3243.

Söllinger A, Tveit AT, Poulsen M, Noel SJ, Bengtsson M, Bernhardt J, Frydendahl Hellwing AL, Lund P, Riedel K, Schleper C, Højberg O, Urich T. 2018. Holistic assessment of rumen microbiome dynamics through quantitative metatranscriptomics reveals multifunctional redundancy during key steps of anaerobic feed degradation. mSystems 3: e00038-18.

Sousa EC, Uchôa-Thomaz AMA, Carioca JOB, Morais SMD, Lima AD, Martins CG, Rodrigues LL. 2014. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (Vitis vinifera L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. Food Sci. Tech. 34(1):135-142.

Sphangero M, Salem AZM, Robinson PH. 2009. Chemical composition, including secondary metabolites, and rumen fermentability of seeds and pulp of Californian (USA) and Italian grape pomaces. Anim. Feed Sci. Technol. 152:243–255.

Spigno G, Marinoni L, Garrido GD. 2017. State of the art in grape processing by-products. In Handbook of Grape Processing By-Products; Galankis, C.M., Ed.; Academic Press: London, UK.

Spinei M, Oroian M. 2021. The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. Foods. 10(4):867.

Stevenson DM, Weimer PJ. 2007. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. Appl. Microbiol. Biot. 75:165-174.

Suescún-Ospina ST, Vera N, Astudillo R, Yunda C, Williams P, Allende R, Avila-Stagno Y. 2022. Effects of País grape marc inclusion in high and low forage diets: ruminal fermentation, methane production and volatile fatty acids. Ital. J. Anim. Sci. 21(1):924-933.

Sutton M.A, Bleeker A, Howard CM, Bekunda M, Grizzetti B, de Vries W, van Grinsven HJM, Abrol YP, Adhya TK, Billen G, Davidson EA, Datta A, Diaz R, Erisman JW, Liu XJ, Oenema O, Palm C, Raghuram N, Reis S, Scholz RW, Sims T, Westhoek H, Zhang FS 2013. Our Nutrient World: The challenge to produce more food and energy with less pollution. Global Overview of Nutrient Management. Centre for Ecology and Hydrology, Edinburgh on behalf of the Global Partnership on Nutrient Management and the International Nitrogen Initiative.

Takeuchi H, Trang VT, Morimoto N, Nishida Y, Matsumura Y, Sugiura T. 2014. Natural products and food components with anti-Helicobacter pylori activities. World J. Gastroenterol. 20:8971–8978.

Tan P, Liu H, Zhao J, Gu X, Wei X, Zhang X, Ma N, Johnston LJ, Bai Y, Zhang W, Nie C, Ma X. 2021.Amino acids metabolism by rumen microorganisms: Nutrition and ecology strategies to reduce nitrogen emissions from the inside to the outside. Science of The Total Environment Volume 800, 149596.

Taşeri L, Aktaş M, Şevik S, Gülcü M, Uysal Seçkin G, Aktekeli B. 2018. Determination of drying kinetics and quality parameters of grape pomace dried with a heat pump dryer. Food Chem. 260:152–159.

Tayengwa T, Chikwanha O C, Raffrenato E E R, Dugan M, Mutsvangwa T, Mapiye C. 2021. Comparative effects of feeding citrus pulp and grape pomace on nutrient digestibility and utilization in steers. Animal. 15:100020.

Tedeschi LO, Muir JP, Naumann HD, Norris AB, Ramírez-Restrepo CA, Mertens-Talcott SU. 2021. Nutritional aspects of ecologically relevant phytochemicals in ruminant production. Frontiers in Veterinary Science, 8, 155.

Teles ASC, Chávez DWH, Gomes FS, Cabral LMS, Tonon RV. 2018. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. Braz. J. Food Technol. 21:1-7.

Terefe NS, Delon A, Buckow R, Versteeg C. 2015. Blueberry polyphenol oxidase: characterization and the kinetics of thermal and high-pressure activation and inactivation. Food Chem. 188:193-200.

Thanh LP, Kha PTT, Loor JJ, Hang TTT. 2022. Grape seed tannin extract and polyunsaturated fatty acids affect in vitro ruminal fermentation and methane production. J. anim. Sci. 100(3):1-9.

Tian X Z, Li JX, Luo QY, Zhou D, Long QM, Wang X, Wen, G. L. 2021. Effects of Purple Corn Anthocyanin on Blood Biochemical Indexes, Ruminal Fluid Fermentation, and Rumen Microbiota in Goats. Frontiers in Veterinary Science, 1036.

Trujillo-Mayol I, Céspedes-Acuña C, Silva FL, Alarcón-Enos J. 2019. Improvement of the polyphenol extraction from avocado peel by assisted ultrasound and microwaves. Journal of Food Process Engineering 42.6: e13197.

Tseng A, Zhao Y. 2012. Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). J Food Sci. 77(9):H192.

Ungerfeld EM. 2015. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. Front Microbiol. 6:37.

Unusan N. 2020. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. J Funct Foods. 67:103861.

Uwizeye A, de Boer IJM, Opio CI, Schulte ROP, Falcucci A, Tempio G, Teillard F, Casu F, Rulli M, Galloway JN, Leip A, Erisman JW, Robinson TP, Steinfeld H, Gerber PJ. 2020. Nitrogen emissions along global livestock supply chains. Nat. Food 1:437–446.

Vargas J, Ungerfeld E, Muñoz C, Di Lorenzo N. 2022. Feeding Strategies to Mitigate Enteric Methane Emission from Ruminants in Grassland Systems. Animals. 12:1132.

Vargas JE, Andrés S, Snelling TJ, López-Ferreras L, Yáñez-Ruíz DR, García-Estrada C, López, S. 2017. Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, in vitro fermentation and digesta fatty acid profile. Frontiers in microbiology. 8, 1124.

Vargas-Bello-Pérez E, Cancino-Padilla N, Romero J, Garnsworthy PC. 2016. Quantitative analysis of ruminal bacterial populations involved in lipid metabolism in dairy cows fed different vegetable oils. Animal. 10(11):1821-1828.

Vašeková P, Juráček M, Bíro D, Šimko M, Gálik B, Rolinec M, Ivanišová, E. 2020. Bioactive compounds and fatty acid profile of grape pomace. Acta Fytotechn. Zootechn, 23, 230-235.

Vashisth T, Singh RK, Pegg RB. 2011. Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. Food Sci. Technol. 44 (7):1649–1657.

Vasta VM, Makkar HPS, Mele M, Priolo A. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. Br. J. Nutr. 102:82-92.

Vasta V, Daghio M, Cappucci A, Buccioni A, Serra A, Viti C, Mele M. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. J. Dairy Sci. 102:3781–3804.

Vastolo A, Calabrò S, Cutrignelli MI. 2022. A review on the use of agro-industrial co-products in animals' diets. Ital. J. Anim. Sci. 21(1):577-594.

Vera N, Gutiérrez C, Allende R, Williams P, Fuentealba C, Ávila-Stagno J. 2018. Dose–response effect of a pine bark extract on in vitro ruminal ammonia and methane formation kinetics. Acta Agric. Scand. - A: Anim. Sci. 68:181-189.

Vera N, Gutiérrez C, Williams P, Fuentealba C, Allende R, Ávila–Stagno J. 2021. Low concentrations of a polyphenolic extract from pine bark in high–concentrate diets decrease in vitro rumen ammonia nitrogen but not methane production. J. Appl. Anim. Res.49(1): 413-422.

Vera N, Gutiérrez-Gómez C, Williams P, Allende R, Fuentealba C, Ávila-Stagno J. 2022. Comparing the Effects of a Pine (Pinus radiata D. Don) Bark Extract with a Quebracho (Schinopsis balansae Engl.) Extract on Methane Production and In Vitro Rumen Fermentation Parameters. Animals. 12(9):1080.

Verma S, Taube F, Malisch CS. 2021. Examining the Variables Leading to Apparent Incongruity between Antimethanogenic Potential of Tannins and Their Observed Effects in Ruminants—A Review. Sustainability. 13(5):2743

Vieira C, Guerra-Rivas C, Martínez B, Rubio B, Manso T. 2022. Effects of grape pomace supplementation on the diet of lactating ewes as compared to vitamin E on the meat shelf life of suckling lambs. Meat Sci.184,108666.

Villarroel M. 2009. Caracterización del contenido de proantocianidinas en las uvas País Negra (Vitis vinífera L) del Valle del Itata (Tesis). Concepción (Chile): Universidad de Concepción.

Vinyard J, Myers C, Chibisa G. 2018. 76 Nutrient intake, apparent total tract nutrient digestion and N excretion in backgrounding cattle fed increasing amounts of grape pomace. J. Anim. Sci. 96:399-400.

Vinyard JR, Myers CA, Murdoch GK, Rezamand P, Chibisa GE. 2021. Optimum grape pomace proportion in feedlot cattle diets: ruminal fermentation, total tract nutrient digestibility, nitrogen utilization, and blood metabolites, Journal of Animal Science, Volume 99, Issue 2.

Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production— Progress and challenges. Anim Feed Sci Technol. 147:116– 39.

Wang L, Zhang G, Li Y, Zhang Y. 2020. Effects of High Forage/Concentrate Diet on Volatile Fatty Acid Production and the Microorganisms Involved in VFA Production in Cow Rumen. Animals.10(2):223.

Wang T, Jiao JX, Wang HC, Degen AA, Gou NN, Li SS. 2021. The effects of supplementing sweet sorghum with grapeseeds on dry matter intake, average daily gain, feed digestibility and rumen parameters and microbiota in lambs. Anim. Feed Sci. Tech. 272:114750.

Wannamethee SG, Jefferis BJ, Lennon L, Papacosta O, Whincup PH, Hingorani AD, 2018. Serum conjugated linoleic acid and risk of incident heart failure in older men: the British regional heart study. J. Am. Heart Assoc. 7:e006653.

Watrelot AA, Norton EL. 2020. Chemistry and Reactivity of Tannins in Vitis spp.: A Review. Molecules. 25:2110.

Williams SRO, Fisher PD, Berrisford T, Moate PJ, Reynard K. 2014. Reducing methane on-farm by feeding diets high in fat may not always reduce life cycle greenhouse gas emissions. Int. J. Life Cycle Assess. 19:69–78.

Williams SRO, Hannah MC, Eckard RJ, Wales WJ, Moate PJ. 2020. Supplementing the diet of dairy cows with fat or tannin reduces methane yield, and additively when fed in combination. Animal.14(S3):s464-s472.

Winkler A, Weber F, Ringseis R, Eder K, Dusel G. 2015. Determination of polyphenol and crude nutrient content and nutrient digestibility of dried and ensiled white and red grape pomace cultivars. Archiv. anim nutrit. 69(3):87-200.

Wischer G, Boguhn J, Steingaß H, Schollenberger M, Rodehutscord M. 2013. Effects of different tannin-rich extracts and rapeseed tannin monomers on methane formation and microbial protein synthesis in vitro. Animal. 7(11):1796-1805.

Wischer G, Greiling A, Boguhn J, Steingass H, Schollenberger, M, Hartung K, Rodehutscord M. 2014. Effects of long-term supplementation of chestnut and valonea extracts on methane release, digestibility and nitrogen excretion in sheep. Animal. 8:938–948.

Witzig M, Zeder M, Rodehutscord M. 2018. Effect of the ionophore monensin and tannin extracts supplemented to grass silage on populations of ruminal cellulolytics and methanogens in vitro. Anaerobe. *50*:44-54.

Wu H, Zhang P, Zhang F, Shishir MSR, Chauhan SS, Rugoho I, Suleria H, Zhao G, Cullen B, Cheng L. 2022. Effect of Grape Marc Added Diet on Live Weight Gain, Blood Parameters, Nitrogen Excretion, and Behaviour of Sheep. Animals. 12:225.

Xu X, Sharma P, Shu S, Lin T, Ciais P, Tubiello F, Smith P, Campbell N, Jain AK. 2021. Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. Nat Food 2:724–732.

Yogianto Y, Sudarman A, Wina E, Jayanegara A. 2014. Supplementation effects of tannin and saponin extracts to diets with different forage to concentrate ratio on in vitro rumen fermentation and methanogenesis. J. Indones. Trop. Anim. Agric. 39:144-151.

Yusuf AL, Adeyemi KD, Samsudin AA, Goh YM, Alimon AR, Sazili AQ. 2017. Effects of dietary supplementation of leaves and whole plant of Andrographis paniculata on rumen fermentation, fatty acid composition and microbiota in goats. BMC Vet. Res. 13:349.

Zeller WE. 2019. Activity, purification, and analysis of condensed tannins: Current state of affairs and future endeavors. Crop Sci. 59:886–904

Zhang CM, Guo YQ, Yuan ZP, Wu YM, Wang JK, Liu JX, Zhu WY. 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. Anim Feed Sci Technol. 146:259-269

Zhang, H., J. Tong, Z. Wang, B. Xiong, and L. Jiang. 2020. Illumina MiSeq sequencing reveals the effects of grape seed procyanidin on rumen archaeal communities in vitro. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 33:61–68

Zhang X, Ke W, Ding Z, Xu D, Wang M, Chen M, Guo X. 2022. Microbial mechanisms of using feruloyl esterase-producing Lactobacillus plantarum A1 and grape

pomace to improve fermentation quality and mitigate ruminal methane emission of ensiled alfalfa for cleaner animal production. J. Environ. Manage. 308:11463

Zhao JX, Li Q, Zhang RX, Liu WZ, Ren YS, Zhang CX, Zhang JX. 2018. Effect of dietary grape pomace on growth performance, meat quality and antioxidant activity in ram lambs. Anim. Feed Sci. Tech. 236:76–85.

Zhou M, Chen Y, Guan LL. 2015. Rumen Bacteria. In: Puniya A., Singh R., Kamra D. (eds) Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution. Springer, New Delhi.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES GENERADAS DE ESTE TRABAJO

PUBLICACIONES

Suescun-Ospina S, Vera N, Astudillo R, Avila-Stagno J. 2021. PSXIV-6 País grape marc (Vitis vinifera, País) inclusion in concentrate diets reduces ammonia nitrogen but not methane production in an in vitro *batch* culture. Journal of Animal Science, 99(Supplement_3), 469-470.

Suescun-Ospina S, Vera N, Astudillo R, Avila-Stagno, J. 2021. PSXIII-4 Effects of "País" grape marc on in vitro methane production and ruminal fermentation parameters of a forage diet. Journal of Animal Science, 99(Supplement_3), 468-468.

Suescún-Ospina ST, Vera N, Astudillo R, Yunda C, Williams P, Allende R, Avila-Stagno Y. 2022. Effects of País grape marc inclusion in high and low forage diets: ruminal fermentation, methane production and volatile fatty acids. Ital. J. Anim. Sci. 21(1):924-933.

Suescun–Ospina, S. T., Ávila–Stagno, J., Vera-Aguilera, N., Astudillo-Neira, R., Trujillo-Mayol, I., & Alarcón-Enos, J. (2023). Effects of drying method on bioactive compounds contents, rumen fermentation parameters and in vitro methane output of waste dried País grape (Vitis vinifera L.) marc. *Food Bioscience*, *51*, 102154.

PRESENTACIONES

Efectos de la inclusión de orujo de uva deshidratado sobre la digestibilidad de la dieta, producción de gas y metano en condiciones *in vitro*, presentado en el XLIV Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal SOCHIPA 2019, Chillán 6-8 noviembre de 2019.

Efectos de adición de orujo de uva sobre la producción de metano y digestibilidad de dietas contrastantes en un sistema Rusitec. Presentación oral, XLIV Congreso Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Temuco 11-13 de noviembre de 2020.

Evaluación de la cinética de producción de gas y metano del orujo de uva País, como suplemento para rumiantes. Presentado en el 43° Congreso Argentino de Producción Animal - Virtual, 25-27 de noviembre de 2020.

Evaluación de la cinética de la DIVMS y parámetros de fermentación ruminal del orujo de uva cv. País. Presentado en el 43° Congreso Argentino de Producción Animal - Virtual, 25-27 de noviembre de 2020.

Effects of “País” grape marc on in vitro methane production and ruminal fermentation parameters of a forage diet, presentado en el 2021 ASAS–CSAS-SSASAS Annual Meeting and Trade Show July 14-18, Kentuky, 2021

País grape marc (Vitis vinifera, País) inclusion in concentrate diets reduces ammonia nitrogen but not methane production in an in vitro *batch* culture. Presentado en el 2021 ASAS–CSAS-SSASAS Annual Meeting and Trade Show July 14-18, Kentuky, 2021.

Efectos de un extracto polifenolico de orujo de uva sobre parámetros de fermentación ruminal y producción de metano en un sistema de fermentación RUSITEC. Presentado en el XLVI Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal SOCHIPA 2021. 10-12 de noviembre de 2021.