

## Effect of the use of fermentation promoters with or without probiotics on the profile of fatty acids, amino acids and cholesterol of milk from grazing cows<sup>1</sup>

### Efecto de la utilización de los promotores de la fermentación, con probióticos o sin ellos, en el perfil de ácidos grasos, aminoácidos y colesterol de la leche de vacas en pastoreo

M.A. Galina<sup>1</sup>, A. Elías<sup>2</sup>, P. Vázquez<sup>3</sup>, J. Pineda<sup>4</sup>, B. López<sup>1</sup>, and M.A. Velázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Cuba

<sup>3</sup>CICATA Instituto Politécnico Nacional México

<sup>4</sup>FMVZ Universidad de Colima

Email: miguelgalina@hotmail.com

This study reviews the development and use of fermentation promoters and probiotics on the profile of fatty acids, amino acids and cholesterol of milk from grazing cows. A herd of 35 cows (511 ± 12 kg), which were in the middle of lactation, Zebu crossings, over a silvopastoral system with star grass (*Cynodon plectostachyus*) and brachiaria (*Brachiaria brizantha*), and browsing legumes, with 3 kg of fermented promoters (FP), were provided with 1.5 kg of lactobacilli per day as supplement (LAB). The grazing area was 20.9 ha. Another herd of 28 animals (514 ± 14 kg), grazing on 18.5 ha, supplemented with 6 kg/d of a commercial concentrate with 160 g of commercial probiotic (CP), was used. An amount of 8 commercial milks were sampled. The milk from the three treatments was weighed each week. The average of production was 17 kg for LAB, of 14 kg/d in silvopastoral system (SP) and 16 kg in CP (P<0.05). The saturated fatty acids and unsaturated fatty acids showed differences in the three treatments (P<0.05). Polyunsaturated fatty acids, omega 3 and conjugated linoleic acid were 34%, 46% and 68% higher in CP, silvopastoral system and LAB compared to commercial milk (CM). Results have demonstrated that grazing diverse green fresh forages improve milk quality due to the increase of unsaturated fatty acids. The LAB allowed a decrease of biohydrogenation. LAB and SP provided the milks with highest amount of omega 3.

Key words: *probiotic, quality, milk, cows, tropic*

#### Introduction

The original studies on management of ruminal fermentation were carried out by Cuban researchers (Elías, 1971), with a posterior large revision on its use (Elías 1983). Later, several studies were published in Mexico, about the effect of FP on different species and grazing systems, with an increase on the use of cellulose of fiber forages due to a significant increase on cellulolytic bacteria population (Galina *et al.* 2000, 2002, 2003, Galina *et al.* 2004abc, Ortiz *et al.* 2001, 2002 and Puga *et al.* 2001abc). On the other hand, the knowledge about the importance of nitrogen degradation, by ruminal microorganisms, has allowed a rational inclusion of urea on diets, plus mechanical or chemical treatments of forages that improve their

En este estudio se hace una revisión del desarrollo y utilización de los promotores de la fermentación y probióticos y su efecto en el perfil de ácidos grasos, colesterol y aminoácidos de la leche en pastoreo. Se utilizó un hato de 35 vacas (511 ± 12 kg), cruzas Cebú, en la mitad de la lactación, en sistema silvopastoril de estrella (*Cynodon plectostachyus*) e insurgente (*Brachiaria brizantha*), con ramoneo de leguminosas, con 3 kg de promotores de la fermentación, a los que se les adicionó 1.5 kg al día de lactobacilos como suplemento. El área de pastoreo fue de 20.9 ha. Se utilizó además un hato de 28 animales (514 ± 14 kg) en pastoreo en 18.5 ha, suplementados con 6 kg/d de un concentrado comercial con 160 g de probiótico comercial. Se muestrearon ocho leches comerciales. Se pesó la leche de los tres tratamientos cada semana. El promedio de producción fue de 17 kg para lactobacilos, de 14 kg/d en sistema silvopastoril y 16 kg en concentrado comercial (P < 0.05). Los ácidos grasos saturados y ácidos grasos no saturados mostraron diferencias en los tres tratamientos (P < 0.05). Los ácidos grasos polinsaturados, el omega 3 y el ácido linoleico conjugado fueron 34 %, 46 % y 68 % mayores en concentrado comercial, sistema silvopastoril y lactobacilos, con respecto a la leche comercial. Los resultados demostraron que el pastoreo de forrajes frescos verdes diversos mejora la calidad de la leche, debido al incremento de ácidos grasos no saturados. Los lactobacilos permitieron que disminuyera la biohidrogenación. Con los lactobacilos y el sistema silvopastoril se obtuvieron las leches con mayor cantidad de omega 3.

Palabras clave: *probiótico, calidad, leche, vacas, trópico*

#### Introducción

Investigadores de Cuba (Elías 1971) elaboraron trabajos originales acerca del manejo de la fermentación ruminal (FR) Luego realizaron una extensa revisión acerca de su utilización (Elías 1983). Posteriormente, se publicaron en México varios trabajos sobre el efecto de los promotores de la fermentación en diferentes especies y sistemas de pastoreo. En ellos se constató aumento de la utilización de la celulosa de los forrajes fibrosos, debido al incremento significativo en la población de bacterias celulolíticas (Galina *et al.* 2000, 2002, 2003, 2004abc, Ortiz *et al.* 2001, 2002 y Puga *et al.* 2001abc). El conocimiento de la importancia de la degradación del nitrógeno por los microorganismos ruminales ha permitido una inclusión racional de la urea en las dietas,

<sup>1</sup>Paper presented at the V Congreso de Producción Animal Tropical, La Habana, Cuba, 2015

digestibility, with the use of FP and LAB (Galindo and Marrero 2005, Ortiz *et al.* 2007, Gutiérrez *et al.* 2012ab). The formation of microbial intestinal digestible protein (PDIM) may reach 80% or more in diets containing an abundant production of ruminal microorganisms in formulas supplemented with non-protein nitrogen sources, while with commercial concentrates, most of the intestinal digestible protein comes from food (PDIA). Therefore, several techniques have been used for protecting protein against the action of ruminal microorganisms (Elías 1983).

Grasses and some legumes provide the base for animal feeding in tropical husbandry. It is characterized by a group of genera and species, and by their wide adaptation to different environments, known as "plasticity" (Peters *et al.* 2010 and Tifton *et al.* 2010). It is possible to use these forages efficiently when bacterial populations of rumen cover the energy requirements, essential nitrogen constituents, minerals and other nutrients (Elías 1983). Otherwise, it could reduce its intake and usage, which could be corrected with the use of activators of ruminal fermentation that increase digestive efficiency (Puga *et al.* 2001abc). The responses to the use of microbial activators, which are more frequently repeated in these studies, are associated to the production of volatile fatty acids (VFA), modification of ruminal pH and increase of bacteria that are responsible for fiber degradation (Lila *et al.* 2004).

During the last years, the Institute of Animal Science (ICA) from Cuba has developed a biologically active product called VITAFERT, enriched with yeasts and lactobacilli, organic acids of short carbonated chains, trace elements and a low pH (Elías and Herrera 2008 and Gutiérrez *et al.* 2012ab). This product has been used as microbial additive in pigs and calves, to prevent or decrease diarrheas, as growth stimulant for non-ruminant animals, and in the ruminal fermentation of cattle (Gutiérrez 2005).

From the first decade of this century, modifications on the use of lactic bacteria in ruminants were added to the original works on ruminal fermentation (Elías and Herrera, 2008). This demonstrated its effectiveness on digestibility of fibrous forages (Galina *et al.* 2007ab and Gutiérrez *et al.* 2012ab). The results of all these researches have had a significantly higher effect on fiber degradation in the rumen that has allowed the development of alternative management systems with or without LAB supplementation to improve product quality (Gutiérrez *et al.* 2012a).

On the other hand, studies on the profile of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly linoleic acid (LA, C18:3 cis-9, cis-12) and conjugated alpha linoleic acid (CLA, C18:3 cis-9, cis-12, cis-15), have demonstrated that they can be found, in high proportions, in lipids of forage and of some

además de tratamientos mecánicos o químicos de los forrajes que mejoran su digestibilidad, con el uso de promotores de la fermentación, como son los lactobacilos (Galindo y Marrero 2005, Ortiz *et al.* 2007 y Gutiérrez *et al.* 2012ab). La formación de proteína digestible intestino microbiana (PDIM) puede llegar a ser 80 % o más en dietas que contengan una producción abundante de microorganismos ruminales, en fórmulas suplementadas con fuentes de nitrógeno no proteico, mientras que con concentrados comerciales la mayor parte de la proteína digestible en el intestino proviene del alimento (PDIA). Por ello, se han utilizado varias técnicas de protección de la proteína contra de la acción de los microorganismos ruminales (Elías 1983).

Las gramíneas y algunas leguminosas constituyen la base de la alimentación animal en la ganadería tropical, caracterizada por una gama de géneros y especies y por su amplia adaptación a diferentes ambientes, también llamada plasticidad (Tifton *et al.* 2009 y Peters *et al.* 2010). Es posible utilizar eficientemente estos forrajes cuando las poblaciones bacterianas del rumen cubren sus requerimientos de energía, constituyentes nitrogenados esenciales, minerales y otros nutrientes (Elías 1983). De no lograrlo, se reduciría su consumo y aprovechamiento, aspecto que pudiera ser corregido con el uso de activadores de la fermentación ruminal, productos biológicos que incrementan la eficiencia digestiva (Puga *et al.* 2001abc). Las repuestas que con mayor frecuencia se repiten en estos trabajos de utilización de activadores microbianos se asocian con la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), modificación del pH ruminal e incremento de las bacterias responsables de la degradación de la fibra (Lila *et al.* 2004).

En los últimos años, el Instituto de Ciencia Animal de Cuba desarrolló un producto biológicamente activo, denominado VITAFERT. Se caracteriza por ser rico en levaduras y lactobacilos, ácidos orgánicos de cadenas carbonadas cortas, minerales traza y bajo pH (Elías y Herrera 2008 y Gutiérrez *et al.* 2012ab). Se ha utilizado como aditivo microbiano en cerdos y terneros para prevenir o disminuir cuadros diarreicos, como estimulante del crecimiento, en el caso de animales no rumiantes, y en la fermentación ruminal del ganado vacuno (Gutiérrez 2005).

A partir de la primera década de este siglo, los trabajos originales sobre FR se modificaron con el uso de bacterias lácticas en rumiantes (Elías y Herrera 2008). Con ello se demostró su efectividad en la digestibilidad de forrajes fibrosos (Galina *et al.* 2007ab y Gutiérrez *et al.* 2012ab). En estas investigaciones, el efecto de la degradación de la fibra en el rumen fue significativamente mayor, lo que ha permitido el desarrollo de sistemas de manejo alternativos, con suplementación de lactobacilos (LAB) para mejorar la calidad del producto (Gutiérrez *et al.* 2012a).

Estudios sobre el perfil de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), particularmente el ácido

supplements (Shen 2011, Castillo *et al.* 2013, Zened *et al.* 2013 and Rubino 2014). These acids are part of the diet of ruminants and, depending on their concentration, modify the profile of fatty acids from milk and meat. Their composition is characterized by having a higher volume of unsaturated fatty acids than of saturated ones, which increase their saturation because of the process of BH in the rumen (Castillo *et al.* 2013). Several factors that affect the process of BH from LA and CLA have been studied, as well as nutritional strategies showing positive results in the increase of trans-vaccenic acid (C18:2 trans-11, TVA) and conjugated linoleic acid (Cis18:2 cis-9, trans-11, CLA) in milk (Galina *et al.* 2009a, 2010, 2012). These compounds have potential benefit effects to human health (Hartfoot and Hazlewood 1997, O'shea *et al.* 1998, Herrera *et al.* 2004 and Khanal 2004).

Lactic probiotics (LAB) may be an important alternative, mainly if the profile of unsaturated fatty acids of the product is taken into consideration (Galina *et al.* 2012). In ruminants, the microbial flora is used for expanding most of the nutrients, which are later absorbed in the intestine of animals (Newbold *et al.* 2005). Therefore, different biotechnological systems have been developed in order to manipulate the microbiological activities of the fermentation chamber of bovines (Newbold *et al.* 2005). Unsaturated fatty acids, produced during the hydrolysis of lipids of diets, are saturated by ruminal microorganisms, through BH, requiring H<sub>2</sub> to develop (Jin *et al.* 2008 and Castillo *et al.* 2013). The best intermediary for BH is the polyunsaturated fatty acids (PUFA), while the conjugated linoleic acid (CLA) and the trans-vaccenic acid (trans 11 C18:1 TVA) are the best intermediary for ruminal bacteria. The CLA derives from linoleic acid (C 18:2) and from  $\alpha$  linoleic acid (C 18:3) (Castillo *et al.* 2013). An advisable manipulation of ruminal fermentation may increase the main forms of CLA, such as isomers cis 19, trans 11 C 18:2, c9, T11 CLA (Newbold *et al.* 2005). Due to the removal of CLA as intermediary depends on BH, maybe it is possible to increase this process, providing electron receptors as an alternative. Ruminal lactic bacteria may use these electrons to decrease BH, and they do not produce methane. Therefore, it is important to study the effect of BH of lactic supplements, to improve the profile of fatty acids from milk (Galina *et al.* 2012).

The objective of this study was to revise the progress in the management of ruminal fermentation, particularly evaluate the effect of LAB supplement on milk production and its profile of essential fatty acids in animals grazing and browsing in a mixed system of grasslands and tropical forest, with or without the use of RF, alone or together with LAB, compared to commercial concentrates supplementation (COM).

linoléico (AL) (C18,3 cis-9, cis-12,) y el ácido alfa-linoléico conjugado (ALC) (C18:3 cis-9, cis-12, cis-15), han demostrado que se encuentran en altas proporciones en los lípidos de los forrajes y de algunos suplementos (Shen *et al.* 2011, Castillo *et al.* 2013, Zened *et al.* 2013 y Rubino 2014). Estos ácidos forman parte de la dieta de los rumiantes y, en dependencia de su concentración, modifican el perfil de ácidos grasos de la leche y de la carne. Su composición se caracteriza por la presencia de mayor volumen de ácidos grasos insaturados que saturados, que aumentan en su saturación debido al proceso de biohidrogenación en el rumen (Castillo *et al.* 2013). Se han estudiado diversos factores que afectan el proceso de biohidrogenación (BH) del AL y del ALC, como también estrategias nutricionales que muestran resultados positivos en el incremento de ácido trans-vaccénico (ATV) (C18:2 trans-11, ATV) y ALC (Cis 18:2 cis-9, trans-11, ALC) en la leche (Galina *et al.* 2009a, 2010, 2012). Se ha informado que estos compuestos tienen efectos potencialmente benéficos para la salud humana (Hartfoot y Hazlewood 1997, O'Shea *et al.* 1998, Herrera *et al.* 2004 y Khanal 2004).

Los probióticos lácticos (LAB) podrían ser una alternativa importante, particularmente si se toma en consideración el perfil de ácidos grasos no saturados del producto (Galina *et al.* 2012). En los rumiantes, la flora microbiana sirve para desdoblar la mayoría de los nutrientes, los que después se absorben en el intestino (Newbold *et al.* 2005). Por ello, se han desarrollado diferentes sistemas biotecnológicos para manipular las actividades microbiológicas de la cámara de fermentación de los bovinos (Newbold *et al.* 2005). Los ácidos grasos no saturados, que se producen durante la hidrólisis de los lípidos de la dieta, son saturados por los microorganismos ruminales mediante la BH, proceso que requiere de H<sub>2</sub> (Jin *et al.* 2008 y Castillo *et al.* 2013). El mayor intermediario para la BH son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), mientras que por las bacterias ruminales son el ALC y el ATV (trans 11 C18:1 ATV). El ALC se deriva del AL (C 18:2) y el ácido  $\alpha$  linoleico (C 18:3) (Castillo *et al.* 2013). Una manipulación recomendable de la fermentación ruminal podría incrementar las principales formas de ALC isómero cis 19, trans 11 C 18:2, c9, T11 ALC (Newbold *et al.* 2005). Debido a que la remoción de ALC como intermediario depende de la BH, quizás sea posible de incrementar este proceso, si se provee alternativamente receptores de electrones. Las bacterias lácticas en el rumen pueden utilizar estos electrones disminuyendo la BH, además de que no producen metano. Es por ello que resulta importante estudiar el efecto de BH de los suplementos lácticos para mejorar el perfil de ácidos grasos de la leche (Galina *et al.* 2012).

El objetivo de este estudio fue revisar los avances en el manejo de la fermentación ruminal. Se enfatizó, particularmente, en la evaluación del efecto de un suplemento LAB en la producción de leche y su perfil

## Material and Methods

The study was carried out in "El Fresno" farm, Suchitlán, Colima, at 19°23' N, 103°41' W, and 1,400 m o.s.l. According to Köppen, the climate is classified as Aw1 (w), with rains from July to October, 1,000 mm per year. Dry period lasts from 8 to 9 months, with an average temperature of 25°C.

A herd of 35 milking cows was used, which were in the middle of lactation (511 ± 12 kg), and Zebu crossed. The animals were grazing in a silvopastoral system (SP) since July, which contained a mixture of tropical grasses from "zacates": star grass (*Cynodon plectostachyus*) and brachiaria (*Brachiaria brizantha*), with browsing of legumes in tropical forest, supplemented with 3 kg of ruminal fermentation agent, with or without the addition of 1.5 kg/day of a probiotic of lactic bacteria (LAB) as a supplement during the silvopastoral period. The total grazing area was 20.9 ha, with a mixture of tropical grasses from "zacates": star grass (*Cynodon plectostachyus*) and brachiaria (*Brachiaria brizantha*), accompanied by browsing of legumes in tropical forest. The browsed tropical forest included *Mimosa pudica*, *Plumera rubra*, *Bunchosia palmeri*, *Cordia alliodora*, *C. dentata*, *Platymiscium fasicarpum*, *Erythroxylum mexicanum*, *E. rotundifolium*, *Caesalpinia plumeria*, *Guttarda elliptica*, *Randiaca pitata*, *Caesalpinia coriaria* and *Desmodium spp.* The stocking rate was between 3.6 and 5.9 AU/ha.

At the same time, a second herd of 28 animals (514 ± 14 kg) was used, which were grazing in 16.5 ha of a silvopastoral system, supplemented with 6 kg of a commercial concentrate per milking cow of 160 g of CP (COM). The milk of the three treatments was weighed individually each week during the observation. Samples were taken, every week, from the milk of each group to measure fatty acids.

During the study, the forage exceeded the capacity of voluntary intake of lactation cows. The supplementation with probiotics (LAB) contained around  $4 \times 10^7$  cfu of lactic bacteria, composed by *Lactobacilos plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*; *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Bifidus spp.* over a mixture of 35% molasses and 65% cheese serum. The fermentation promoter (3kg/d) contained a mixture of molasses (18%), cotton meal (16%), rice skin (10%), maize (14%), poultry manure (10%), fish meal (8%), beef fat (5%), salt (4%), lime, calcium carbonate (3%), cement (1%), mineral salts (2%), calcium orthophosphate (2%), urea (5%) and ammonia sulfate (2%). The volumes of ingested dry matter were calculated per each cow, taking representative samples in grazing, based on the energy and protein needs for maintenance, growth, milk production and physiological state, according to the methodology, which uses the system of milk forage units. (Jarrige 1995)

de ácidos grasos esenciales en animales que pastorean y ramonean en un sistema mixto de praderas y bosque tropical, con la utilización de FR solo o con LAB o sin ella, con respecto a la suplementación con concentrados comerciales (COM).

## Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el rancho "El Fresno", en Suchitlán, Colima, a 19°23' latitud norte, 103°41' longitud oeste y 1.400 m sobre el nivel del mar. Según la clasificación de Köppen, el clima es de tipo Aw1(w), con lluvias de julio a octubre, 1,000 mm anuales. La duración del período seco es de ocho a nueve meses, con temperatura promedio de 25°C.

Se utilizó un hato de 35 vacas lecheras en la mitad de la lactación (511 ± 12 kg), cruzas de Cebú. Los animales se mantuvieron en un sistema silvopastoril (SP), a partir de julio formado por una mezcla de gramíneas tropicales de zacates: estrella (*Cynodon plectostachyus*) e insurgente (*Brachiaria brizantha*), acompañados de ramoneo de leguminosas en bosque tropical, suplementados con 3 kg de fermentador ruminal, con la adición de 1.5 kg/d de un probiótico de bacterias lácticas (LAB) como suplemento o sin ella durante el período silvopastoril. El área de pastoreo total fue de 20.9 ha -una mezcla de pastoreo sobre gramíneas tropicales de zacates: estrella (*Cynodon plectostachyus*) e insurgente (*Brachiaria brizantha*), acompañada de ramoneo de leguminosas en bosque tropical. El bosque tropical ramoneado fue de *Mimosa pudica*, *Plumera rubra*, *Bunchosia palmeri*, *Cordia alliodora*, *C. dentata*, *Platymiscium fasicarpum*, *Erythroxylum mexicanum*, *E. rotundifolium*, *Caesalpinia plumeria*, *Guttarda elliptica*, *Randiaca capitata*, *Caesalpinia coriaria* y *Desmodium spp.*, con una carga animal de 3.6 a 5.9 UA/ha. Paralelamente, se utilizó un segundo hato de 28 animales (514 ± 14 kg) que pastorearon en 16.5 ha de silvopastoril, suplementados con 6 kg de un concentrado comercial (COM) para vaca lechera de 160 g de PC. Se pesó la leche de los tres tratamientos en forma individual cada semana durante la observación. Se tomaron muestras semanales de leche de cada grupo para medir los ácidos grasos.

Durante todo el estudio, el forraje excedía la capacidad de ingestión voluntaria de las vacas en lactación. La administración de suplementos de probióticos (LAB) contenía, aproximadamente,  $4 \times 10^7$  ufc de bacterias lácticas, compuesto por *Lactobacilos plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*; *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, y *Bifidus spp.* sobre una mezcla de 35 % melaza y 65 % suero de quesería. El promotor de la fermentación (3kg/d) contenía mezcla de melaza (18 %), harina de algodón (16 %), cascarilla de arroz (10 %), maíz (14 %), pollinaza (10 %), harina de pescado (8 %), cebo de res (5 %), sal común (4 %), cal, carbonato cálcico (3 %); cemento (1 %), sales minerales (2 %), ortofosfato cálcico (2 %), urea (5 %) y sulfato de amonio (2 %). Se calcularon los volúmenes de materia seca ingerida (MSI) por vaca mediante la toma de muestras representativas en

The analysis of fatty acid methyl esters (FAME) was performed by separate extraction, using gas chromatography (Varian model 3800), equipped with an automatic sampling (CP 8410) and a FID detector. The chromatographer has a capillary column of fused silica (60 m, 0.25 mm (id) 0.25 micra; DB 23 film, J and W Supelco). FAME peaks were identified by comparison with retention times, with a known mixture of fatty acid standards (Sigma-Aldrich).

The volatile compounds were determined using the modified technique of dynamic headspace. Samples were purged by bubbling helium and extraction was carried out for 60 min with helium at a rate of 50 mL/min. Volatile components were absorbed into a glass trap, filled with 0.20 mg of Tenax TA, 60/80 sieve and 0.05 mg of Carbopack C, 40/60 sieve. Thermal desorption was performed by a heating trap at 220 °C for 5 minutes with a flow of helium carrier gas (50 mL/min) in an automatic system of thermal desorption (TDS2, Gerstel GmbH). The gas analysis was performed with a chromatographer, model Agilent 6890 GC N, connected to a detector of selective quadrupole mass (TME), model 5973. A capillary column of fused silica, covered with dimethyl polysiloxane (HP 1, Agilent Technologies, USA) with 30 m, 0.32 mm (id), 0.25 micra of film thickness, was used to analyze the volatile profile of milk. Operating conditions were in a helium flow of 1.2 mL/min, the transfer line to the ME at 250 °C of splitless open interface. Thermal desorption was performed at 220 °C for 5 minutes with a flow of helium carrier gas (50 mL/min), in an automatic thermal desorption system (TDS2, Gerstel GmbH). Operating conditions were in a helium flow of 1.2 mL/min, the transfer line to the ME at 250 °C of splitless open interface. The temperature of the program was 10 min at 40 °C, with heating speed of 10 °C/min up to a peak of calibrated 150 °C for 12 min. The scanned mass spectrometer ranged from 29m/z to 400m/z in 0.5 s of cycle time. The ion source was set at 230 °C and spectra were obtained by electron impact (70 eV). The detected volatile compounds were identified by the study of DM spectra, compared to data of Wiley (Wiley and Son, Germany). Each sample was analyzed in duplicate. Profiles of volatile fatty acids in milk were expressed as percentages. The chromatographer performs an automatic sampling (CP 8410) with FID detector. The chromatographer has a capillary column of fused silica (60 m, 0.25 mm (id) 0.25 micra with DB 23 film, J and W, Supelco). FAME peaks were identified by comparison with retention times, with those of a known mixture of fatty acid standards (Sigma-Aldrich). The standard CLA (cis-9, trans-10, cis-12 3%) was obtained from Larodan (Malmö, Sweden).

Results were calculated by ANDEVA model, using a completely randomized arrangement

pastoreo, sobre la base de las necesidades de energía y proteína para mantenimiento, crecimiento, producción de leche y estado fisiológico, de acuerdo con la metodología y con la utilización del sistema de unidades forrajeras leche, desarrollado por Jarrige (1995).

Los análisis de los ésteres metílicos ácidos grasos (FAME) se realizaron por extracción y por separado, con la utilización de cromatografía de gases (Varian modelo 3800, equipado con un muestreado automático; CP 8410 con detector FID). El cromatógrafo tenía una columna capilar de sílice fundida (60 m, 0.25 mm (di) 0.25 micras; película DB 23, J y W Supelco). Los picos FAME se identificaron por comparación con los tiempos de retención, con respecto a una mezcla conocida de estándares de ácidos grasos (Sigma-Aldrich).

Los compuestos volátiles se determinaron mediante la técnica modificada de dinámica del espacio de cabeza. Las muestras se purgaron por burbujeo de helio y la extracción se llevó a cabo durante 60 min con helio, a una velocidad de 50 mL/min. Los componentes volátiles se absorbieron en una trampa de vidrio lleno de 0.20 mg de Tenax TA, malla 60/80 y 0.05 mg de Carbopack C, malla 40/60. La desorción térmica se llevó a cabo por una trampa de calentamiento a 220 °C durante cinco minutos, con flujo de gas portador de helio (50 mL/min) en un sistema automático de desorción térmica (TDS2, Gerstel GmbH). El análisis gaseoso se realizó en un cromatógrafo, modelo Agilent 6890 GC N, instrumento conectado a un detector de masas cuádruple selectivo (TME) modelo 5973. Una columna capilar de sílice, fundida y revestida con dimetilpolisiloxano (HP 1, Agilent Technologies, USA.) de 30 m, 0.32 mm (di) y 0.25 micras de espesor de la película, se utilizó para analizar el perfil volátil de la leche. Las condiciones de funcionamiento fueron en un caudal de helio de 1.2 mL/min, la línea de transferencia a la EM de 250 °C de interfaz abierto splitless; la temperatura del programa, de 10 min a 40°C, con velocidad de calentamiento de 10°C/ min hasta un pico de 150 °C, calibrada durante 12 min. El espectrómetro de masas escaneada fue de m/z 29 a m/z 400 en tiempo de ciclo de 0.5 s. La fuente de iones se fijó a 230 °C y los espectros se obtuvieron por impacto de electrones (70 eV). Los compuestos volátiles detectados se identificaron por el estudio de los espectros de MS en comparación con los datos de Wiley (Wiley and Son, Alemania). Cada muestra se analizó por duplicado. Los perfiles de ácidos grasos volátiles de la leche se expresaron en porcentajes. El cromatógrafo efectuó un muestreo automático (CP 8410) con detector FID. El aparato tenía una columna capilar de sílice fundida (60 m. 0.25 mm (di) 0.25 micras con una película DB 23, (J y W; Supelco). Los picos FAME se identificaron por comparación de los tiempos de retención con los de mezcla conocida de estándares de ácidos grasos (Sigma-Aldrich). El estándar de ALC (cis-9, trans-10, cis-12 3%) se obtuvo de Larodan (Malmö, Suecia).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_j$$

$Y_{ij}$  = values of fatty acids  $i=1,2,\dots,4$   $j=1,2,\dots,8$

$\mu$  = general mean

$t_i$  = effect of the  $i$ -th treatment

$E_j$  = effect of random error

### Results

The average of milk in both groups was 17.5, (LAB); 14.1 (SP) and 16.5 (COM) kg/d ( $P < 0.05$ ). The feeding system affected significantly the profile of fatty acids in the milk of the studied cows. This effect was measured by the content of fatty acids from feeding systems, in percentages of saturated and unsaturated LAB 66.17:34.04%; SP 65.82:34.23%; COM 67.97:32.30%; CM 67.77:32.35%, as table 1 shows. The content of polyunsaturated fatty acids, omega-3 was LAB 0.51%, SP 0.33% and COM 0.27% superior to those of commercial milk (CM), which had 0.18% of average. Results of omega 6 were 1.77 % LAB, 1.59 % SP and 1.50% COM, while commercial milk had an average of 1.47% ( $P < 0.05$ ). The relation omega 6/omega 3 was 3.47:1 LAB; 4.82:1 SP; 5.16 COM and 8.17 commercial.

Regarding saturated fatty acids, CM and COM were superior to the milk of grazing animals, which showed no differences among them ( $P > 0.05$ ). Unsaturated fatty acids had a similar performance but LAB and SP were superior to COM and CM ( $P > 0.05$ ). Differences among the four milks were found in the percentage of polyunsaturated fatty acids, being intermedia LAB the highest for SP and COM and the lowest for CM ( $P > 0.05$ ). The analysis of variance showed that the feeding system only modified the concentration of polyunsaturated fatty acids ( $P < 0.01$ ). However, monounsaturated fatty acids were only affected ( $P < 0.01$ ) between LAB and SP compared to COM and CM. Regarding polyunsaturated fatty acids, LAB had the highest ( $P < 0.05$ ) percentage, superior to the remaining types of milk. There was significant effect ( $P < 0.01$ ) of feeding system over the different types of milk.

Regarding the profile of amino acids (table 2), there was only significant differences ( $P < 0.05$ ) in lysine and histidine of essential amino acids. However, there was no interaction among factors in the analysis of variance. Lysine concentration was higher in milk with probiotic (1.27%) than in CM (1.04%). Histidine was higher in LB (0.44%) than in CM (0.33) ( $P < 0.05$ ).

Table 3 presents a summary of the content of saturated, monosaturated, and polyunsaturated fatty acids. There is a higher percentage of saturated in COM and CM compared to LAB and SAP. However, it is particularly important the difference in the content of omega 3, being higher in milks of pastors, especially in those supplemented with probiotics. After analyzing the cholesterol content

Los resultados se calcularon por el modelo de ANDEVA, con arreglo totalmente aleatorizado:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_j$$

$Y_{ij}$  = valor de ácidos grasos  $i=1,2,\dots,4$   $j=1,2,\dots,8$

$\mu$  = Es una media general

$t_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$E_j$  = Efecto del error aleatorio

### Resultados

El promedio de producción de leche en ambos grupos fue de 17.5; LAB 14.1 (SP) y 16.5 (COM) kg/d ( $P < 0.05$ ). El sistema de alimentación afectó significativamente el perfil de ácidos grasos de la leche de las vacas estudiadas. Este efecto se midió por el contenido de ácidos grasos de los sistemas de alimentación, en porcentajes de saturados e insaturados LAB 66.17:34.04 %; SP 65.82:34.23 %, COM 67.97:32.30 %, LC 67.77:32.35% (tabla 1). El contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 fue LAB 0.51 %, SP 0.33 %; COM 0.27 %, superiores al de la leche comercial (LC), que tuvo como promedio 0.18 %. Los resultados de omega 6 fueron 1.77 % LAB, 1.59 % SP y 1.50 % COM, mientras que la leche comercial alcanzó como promedio 1.47 % ( $P < 0.05$ ). La relación de omega 6/ omega 3 fue de 3.47:1 LAB, 4.82:1 SP, 5.16 COM y 8.17 comercial.

Con respecto a los ácidos grasos saturados, la LC y el concentrado comercial (COM) fueron superiores a las leches de pastoreo, que no mostraron diferencias entre ellas ( $P > 0.05$ ). Los no saturados se comportaron de forma similar, pero LAB y SP fueron superiores a COM y LC ( $P > 0.05$ ). Las diferencias entre las cuatro leches fue en el porcentaje de poliinsaturados, siendo mayor para LAB intermedia para SP y COM, y menor para la LC ( $P > 0.05$ ). A través del análisis de la varianza se observó que el sistema de alimentación solo modificó la concentración de AG poliinsaturados ( $P < 0.01$ ). Por el contrario, los AG monoinsaturados solamente se afectaron ( $P < 0.01$ ) entre LAB y SP, con respecto a COM y LC. Si se observan los ácidos grasos poliinsaturados, LAB fue mayor ( $P < 0.05$ ) en porcentaje (0.51 %), siendo superior a los demás tipos de leche. Se observó efecto significativo ( $P < 0.01$ ) del sistema de alimentación en los diferentes tipos de leche.

En lo que respecta al perfil de amino ácidos (tabla 2) se observa para los aminoácidos esenciales, únicamente se registraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en lisina e histidina, sin embargo en el análisis de varianza no se observó interacción de los factores. La concentración de lisina fue más alta en la leche con probiótico (1.27%); que en la LC (1.04%). La histidina fue mayor en LB 0.44% respecto a la LC 0.33 ( $P < 0.05$ ).

Un resumen del contenido de ácidos grasos saturados, monosaturados y poliinsaturados se

in different types of samples, LAB recorded a content of 83.2 mg/100 mL and SP registered 84.4 mg/100mL, showing significant differences with COM (87.5 mg/100 mL) and CM(89.1 mg/100 mL). In this regard, the feeding system, with or without probiotics, showed lower amount of cholesterol in both treatments.

An important element is the relation omega 6/omega 3, which, in this observation, was 3.47 for LAB and 4.82 for SP, slightly within a range lower than 5, while the same silvopastoral system, when supplemented with commercial concentrate, has a relation from 5.56 to 1, probably blocking the beneficial effect of omega 3, and the average of commercial milk went from 8.17 to 1. This was superior to the limits that allow a beneficial use for humans.

presenta en la tabla 3; se observa un mayor porcentaje de saturados en COM y LC comparados con LAB y SAP pero es particularmente importante la diferencia en el contenido de omega 3 siendo mayor en las leches de pastoreos especialmente en la suplementada con probióticos. Al analizar el contenido de colesterol en los diferentes tipos de muestras se observó en LAB que registró un contenido de 83.2 mg/100mL y SP 84.4 mg/100mL, mostrando diferencias significativas con COM 87.5 mg/100mL y LC 89.1 mg/100 mL. En este sentido el sistema de alimentación con o sin probióticos, mostró una menor cantidad de colesterol en ambos tratamientos.

Un elemento de primordial importancia es la relación de omega6/omega 3 que en la presente observación fue de 3.47 para LAB y 4.82 para SP ligeramente dentro de los márgenes menores a 5 mientras que el mismo sistema silvopastoril al ser suplementado con concentrado comercial tiene una relación de 5.56 a 1 probablemente bloqueando el efecto benéfico del omega 3, y el promedio de las leches comerciales fue de 8.17 a 1 que es muy superior a los límites que permiten una utilización benéfica para el humano.

Table 1. Percentages of fatty acids in milk of three silvopastoral treatments with LAB probiotic, silvopastoral (SP), silvopastoral with commercial concentrate (COM) and commercial milk (CM)

			LAB	SP	COM	CM	Prob	SE ±
Saturated	Capric	C6	0.47	0.47	0.53	0.44	0.0002	0.06
Saturated	Caprylic	C8	0.46	0.46	0.50	0.41	0.0002	0.05
Saturated	Capric	C10	1.50 <sup>a</sup>	1.73 <sup>a</sup>	1.22 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	0.0001	0.06
Saturated	Lauric	C12	2.50 <sup>a</sup>	2.84 <sup>a</sup>	1.95 <sup>b</sup>	2.14 <sup>b</sup>	0.0002	0.04
Monosaturated	Myristoleic	C14.1	0.74 <sup>b</sup>	1.03 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.0001	0.05
Saturated	Miristic	C14	10.35	11.43	10.62	9.16	0.0002	0.05
Saturated	Pantodecílico	C15	1.94	1.59	1.79	1.54	0.0002	0.04
Monosaturated	Palmitoleic	C16.1	1.75 <sup>a</sup>	1.17 <sup>b</sup>	1.82 <sup>a</sup>	1.65 <sup>a</sup>	0.0002	0.05
Saturated	Palmitic	C16	32.10 <sup>b</sup>	31.52 <sup>b</sup>	35.67 <sup>a</sup>	31.55 <sup>b</sup>	0.0001	0.06
Saturated	Margaric	C17	1.48 <sup>b</sup>	1.08 <sup>c</sup>	1.32 <sup>b</sup>	1.83 <sup>a</sup>	0.0003	0.04
Polysaturated	Linoleic omega 6	C18.2	1.77 <sup>a</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.50 <sup>b</sup>	1.47 <sup>b</sup>	0.0001	0.05
Monosaturated	Oleic	C18.1	29.27	30.11	27.69	28.40	0.0002	0.05
Saturated	Estearic	C18	14.60 <sup>b</sup>	13.23 <sup>b</sup>	13.43 <sup>b</sup>	18.90 <sup>a</sup>	0.0001	0.04
Polysaturated	A Linoleic omega 3	C18.3	0.51 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.27 <sup>c</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.0003	0.06
Saturated	Arachidic	C20	0.77 <sup>b</sup>	1.47 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.0001	0.03
			100.21	100.05	100.27	100.12	0.0001	0.05
	ω3:ω6 rate		3.47 <sup>c</sup>	4.82 <sup>b</sup>	5.56 <sup>b</sup>	8.17 <sup>a</sup>	0.0002	0.06
	Saturated		66.17 <sup>b</sup>	65.82 <sup>b</sup>	67.97 <sup>a</sup>	67.77 <sup>a</sup>	0.001	0.05
	Unsaturated		34.04 <sup>a</sup>	34.23 <sup>a</sup>	32.30 <sup>b</sup>	32.35 <sup>b</sup>	0.002	0.05
	Monosaturated		31.76 <sup>a</sup>	32.31 <sup>a</sup>	30.53 <sup>b</sup>	30.70 <sup>b</sup>	0.001	0.06
	Polysaturated		2.28 <sup>a</sup>	1.92 <sup>b</sup>	1.77 <sup>c</sup>	1.65 <sup>d</sup>	0.002	0.04

<sup>a, b, c, d</sup>Different letters in the same line indicate significant statistical difference (P<0.05).

LB milk of grazing animals with probiotic.

SP milk of grazing animals.

COM milk of grazing animals with commercial concentrate.

CM commercial milk

Table 2. Amino acids in milk of cows in dry matter (percentage)

Amino acids	LB	SP	COM	CM	Prob	SE±
Essential						
Isoleucine	0.66	0.58	0.64	0.60	0.0001	0.06
Leucine	1.23	1.07	1.17	1.05	0.002	0.05
Lysine	1.27 <sup>a</sup>	1.06 <sup>ab</sup>	1.18 <sup>ab</sup>	1.04 <sup>b</sup>	0.0003	0.05
Metionine	0.34	0.29	0.32	0.29	0.0001	0.01
Phenylalanine	0.70	0.63	0.65	0.62	0.001	0.01
Valine	0.86	0.77	0.82	0.78	0.003	0.05
Threonine	0.51	0.43	0.44	0.44	0.0003	0.06
Histidine	0.44 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.37 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.001	0.03
Tryptophan	UD	UD	UD	UD		
Total	3.64	3.77	4.04	3.78	0.001	0.05
Non Essential						
Cysteine	0.07 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.002	0.01
Tyrosine	0.73 <sup>a</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.67 <sup>ab</sup>	0.64 <sup>ab</sup>	0.0001	0.06
Arginine	0.55 <sup>a</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.51 <sup>ab</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.003	0.05
Alanina	0.41 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.002	0.05
Aspartic acid	1.04 <sup>a</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	0.002	0.05
Glutamic acid	2.55 <sup>a</sup>	2.31 <sup>ab</sup>	2.43 <sup>ab</sup>	2.21 <sup>b</sup>	0.003	0.06
Glycine	0.26 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.003	0.04
Proline	1.59 <sup>a</sup>	1.12 <sup>c</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b,c</sup>	0.001	0.01
Serine	0.70 <sup>a</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.63 <sup>ab</sup>	0.58 <sup>ab</sup>	0.001	0.01
Total	7.90 <sup>a</sup>	6.62 <sup>b</sup>	7.23 <sup>ab</sup>	6.64 <sup>b</sup>	0.002	0.02
Total Amino acids	13.91 <sup>a</sup>	11.69 <sup>b</sup>	12.82 <sup>ab</sup>	11.80 <sup>b</sup>	0.003	0.03

<sup>a, b, c</sup>Different letters in the same line indicate significant statistical difference (P<0.05)

Without letter in the same line indicate that there was no significant statistical difference (P>0.05)

UD=undetermined

LB grazing with probiotic

SP grazing

COM grazing with commercial concentrate

CM commercial milk

Table 3. Total concentration of fatty acids in the milk of grazing animals with different supplementation (percentage)

	LAB	SP	COM	CM	Prob	SE ±
Saturated	66.17 <sup>a</sup>	65.82 <sup>b</sup>	67.97 <sup>a</sup>	67.77 <sup>a</sup>	0.002	0.05
Unsaturated	34.04	34.23	32.30	32.35	0.0003	0.06
Monosaturated	31.76 <sup>a</sup>	32.31 <sup>a</sup>	30.53 <sup>b</sup>	30.40 <sup>b</sup>	0.001	0.06
Polyunsaturated	2.28 <sup>a</sup>	1.92 <sup>b</sup>	1.77 <sup>c</sup>	1.65 <sup>d</sup>	0.005	0.05
Omega 3	0.51 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.002	0.06
Omega 6	1.77 <sup>a</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.50 <sup>c</sup>	1.47 <sup>c</sup>	0.0001	0.02
Omega 6: omega 3 relation	3.47 <sup>c</sup>	4.82 <sup>c</sup>	5.56 <sup>b</sup>	8.17 <sup>a</sup>	0.0002	0.05
Cholesterol (mg/100mL)	83.2 <sup>b</sup>	84.4 <sup>b</sup>	87.5 <sup>a</sup>	89.1 <sup>a</sup>	0.001	0.06

<sup>a, b, c</sup>Different letters in the same line indicate significant statistical difference (P<0.05)

LAB milk of grazing animals with probiotic

SP milk of grazing animals

COM milk of grazing animals with commercial concentrate

CM commercial milk



### Discussion

The performance of ingestion and rumination has been widely documented, regarding the nature of diet, essentially, its superior plant maturity and provided fitness. These are aspects that could influence the filling of organs and dry matter degradation rate in the digestive tract (Van Soest 1982). The fermentation promoters (FP) have demonstrated to have the elements that allow a better utilization of cell walls due to several factors including the presence of a source of soluble carbohydrates to offer energy as ATP of anaerobic bacteria (Galina *et al.* 2003).

By analyzing the ruminal liquor, the pH values obtained with the use of FP were  $\pm 6.9$  even when there is no single consensus of pH value where the functioning of ruminal microbiota is optimized. The figures found in all treatments are between the physiological limits of 6.0 and 7.2 (Elías 1971, 1983, Calsamiglia *et al.* 2002 and Krause and Oetzel 2006), as optimal values to guarantee the digestion of cellulose, and favor the increase of growth rate of cellulitic/hemicellulolytic microorganisms, their enzymatic activity and the products of their metabolism (Marrero 2005). The values of pH reached with the FP have a positive effect exerted by microbial activators to stimulate bacterial growth and contribute to increase the DM intake, mainly NDF (Puga *et al.* 2001abc).

Castañeda *et al.* 2010 achieved similar results in the performance of goats and sheep, because they demonstrated an increase of VFAs concentrations from 2 and 8 hours after food ingestion. At the same time, these authors reached a negative correlation ( $r^2 = 0.454$ ,  $P < 0.01$ ) between pH and the concentrations of these organic acids. A similar performance is possible with the use of RF/LAB at this level indicates that in the ruminal mixed ecosystem had to be influenced not only by the concentration of these acids, but also by other factors such as the buffering capacity of the medium (Ramos and Antonio 2009 and Galina *et al.* 2009ab). This should have occurred in these treatments, as a result of increased chewing and rumination, as it was previously stated, which brings about a higher production and segregation of saliva (Gutiérrez *et al.* 2012ab). The possibility of buffering these substances (carbonates and phosphates), plus urea, and amounts of VFAs, acetic and lactic acids, contained in LAB, and produced in the rumen, together with pH stability, should substantially improve the synthesis of microbial protein (Elías 1983), and, consequently, increase animal response.

According to Smith (1975), it is possible to estimate the ruminal microbial mass from the AGVs concentrations. Studies carried out in Cuba determined the optimum level of 6 mL kg LW<sup>-1</sup> of LAB in the ration, for increased production of microbial biomass

### Discusión

El comportamiento en la ingestión y rumia ha sido ampliamente documentado, si se tiene en cuenta la naturaleza de la dieta, en lo esencial, su alta madurez vegetativa y forma física suministrada, aspectos que pudieron influir en el llenado de los órganos y velocidad de degradación de la MS en el tracto digestivo (van Soest 1982). Los PF han demostrado tener los elementos que permiten mejor utilización de las paredes celulares, debido a varios factores, entre los que se incluyen la presencia de una fuente de carbohidratos solubles para la formación de energía en forma de ATP de las bacterias anaerobias (Galina *et al.* 2003).

Al analizar el líquido ruminal, los valores de pH obtenidos con el uso de PF fueron de  $\pm 6.9$ , aún cuando no existe un consenso único del valor de pH donde se optimice el funcionamiento ruminal, las cifras encontradas en la totalidad de los tratamientos se mantienen entre los límites fisiológicos de 6.0 y 7.2 (Elías 1971, 1983, Calsamiglia *et al.* 2002 y Krause y Oetzel 2006), como valores óptimos para garantizar la digestión de la celulosa, y posibilitar el incremento del ritmo de crecimiento de los microorganismos celulíticos/ hemicelulolíticos, su actividad enzimática y con ello, los productos de su metabolismo (Marrero 2005). Los valores de pH alcanzados con los PF tienen efecto positivo en los activadores microbianos, al estimular el crecimiento bacteriano y contribuir al mayor consumo de MS, fundamentalmente de FND (Puga *et al.* 2001abc).

Castañeda *et al.* (2010) lograron resultados semejantes en el comportamiento de cabras y ovinos, al constatar aumento de las concentraciones de AGVs a partir de las 2 y 8 h posteriores a la ingestión de alimento. A la vez que afirmaron alcanzar una correlación negativa ( $r^2 = 0.454$ ,  $P < 0.01$ ) entre el pH y las concentraciones de estos ácidos orgánicos. Un comportamiento análogo es probable con el uso de FR/LAB en este nivel e indica que el ecosistema mixto ruminal hubo de estar influenciado no solo por la concentración de estos ácidos, sino también por otros factores como la capacidad amortiguadora del medio (Ramos y Antonio 2009 y Galina *et al.* 2009ab). Como debió ocurrir en estos tratamientos, producto del aumento de la masticación y rumia, como se evidenció antes, hubo mayor producción y segregación de saliva (Gutiérrez *et al.* 2012ab). La posibilidad de amortiguar estas sustancias (carbonatos y fosfatos), además de la urea y las cantidades de AGVs, acético y láctico contenidos en LAB, y producidos en el rumen, unido a la estabilidad del pH, debieron mejorar sustancialmente la síntesis de proteína microbiana (Elías 1983), y con ello aumentar la respuesta animal.

Según Smith (1975), a partir de las concentraciones

(Gutiérrez *et al.* 2012ab). This evidences better ruminal fermentation and, consequently, more degradation of forage enriched in cell walls and microbial mass, which becomes part of digesta as bypass protein of excellent amino acid composition, leaves the rumen and is absorbed in the small intestine (López 2009).

Although there are several *in vivo* studies describing improvements in degradation rate of DM in the diet of cattle consuming basically fiber, with the addition of microbial additives from mixed cultures of yeast and lactobacilli, such as those conducted by Flores (2000) when using 1% of strains of *Lactobacillus plantarum* in a basic diet containing concentrate and alfalfa, where improvements in degradability were obtained in other studies developed by Castillo (2009) and Gutiérrez *et al.* (2012ab) evaluated microbial preparations of *S. cerevisiae*, related to characteristics of ruminal fermentation in cows fed fiber diets, and found an increase of cellulolytic and total viable bacteria. With the use of LAB, there was a significant improvement in the content of essential fatty acids of milk from the animals (Galina *et al.* 2009 and Elías *et al.* 2010). Nevertheless, differences found in the ingestion of DM and NDF with LAB diet, regarding other treatments of this study, can be attributed to similar effects to those previously achieved in cattle, and thus, an increase of disappearance rate of fibrous material in the rumen, similar to that described by Galina *et al.* (2007).

Gutiérrez *et al.* (2012 ab) stated that, in all treatments with probiotics at different times during incubation kinetics, there were high levels of DM degradation despite the high fiber content, although previously it had low digestibility in fibrous forages, defined as materials of low nutritional value (Pérez Infante 2010), with high levels of NDF and effects on ruminal degradation Vergara and Araujo (2006) found a negative correlation of fiber material with ruminal digestion.

The results with LAB in the ration suggest that there are major changes in the ruminal microbial activity, resulting in an increased of fermentation ability of structural carbohydrates, by degrading complex carbonated chains and release simple strings that were used by cellulolytic bacteria, as energy sources for their growth since their beginning, plus the contribution of LAB with peptides and amino acids within its true protein (Elías, 1983 and Galina *et al.*, 2008ab, 2009a). This is demonstrated during the kinetics performance of the curve, where LAB stimulatory activity was observed, perhaps associated to living cells, plus their activity in the ruminal liquor, since the beginning of degradation kinetics and its extension (Gutiérrez *et al.* 2012b).

In studies of Gutiérrez *et al.* (2012ab), with the use of probiotics, the response to the characteristics during degradation kinetics of DM showed that soluble

AGVs, es posible estimar la masa microbiana del rumen. Trabajos en Cuba determinaron el nivel óptimo de 6 mL kg PV<sup>-1</sup> de LAB en la ración para obtener mayor producción de biomasa microbiana (Gutiérrez *et al.* 2012a, 2012b). Esto evidencia mejor fermentación ruminal y, como consecuencia, mayor degradación de los forrajes ricos en paredes celulares y masa microbiana, que se convierte en parte de la digesta como proteína de sobrepaso de excelente composición aminoacídica, sale del rumen y se absorbe en el intestino delgado (López 2009).

Existen numerosos estudios *in vivo* que describen mejoras en la tasa de degradación de la MS en la dieta de vacunos que consumen básicamente fibra con la adición de aditivos microbianos a partir de cultivos mixtos de levaduras y lactobacilos. Flores (2000), al utilizar 1 % de cepas de *Lactobacillus plantarum* en una dieta básica, elaborada a partir de concentrado y alfalfa, obtuvo mejoras en la degradabilidad. Castillo (2009) y Gutiérrez *et al.* (2012ab), al evaluar un preparado microbiano de *S. cerevisiae* en cuanto a las características de la fermentación ruminal en vacas alimentadas con dietas fibrosas, encontraron aumento de las bacterias viables totales y celulolíticas, con el uso de LAB mejoraron significativamente el contenido de ácidos grasos esenciales en la leche de los animales (Galina *et al.* 2009a y 2012, Elías *et al.* 2010). Sin embargo, en este estudio, con la dieta de LAB, las diferencias en la ingestión de la MS y FND con respecto al resto de los tratamientos, se puede atribuir a efectos similares a los obtenidos en vacunos. Con esta dieta se lograron incrementos en la tasa de desaparición del material fibroso del rumen, muy cercanos a los descritos por Galina *et al.* (2007a).

Gutiérrez *et al.* (2012ab) documentaron que en la totalidad de sus tratamientos con probióticos en los diferentes tiempos, durante la cinética de incubación, a pesar del alto contenido en fibra, hubo niveles altos de degradación de la MS, aunque antes se había observado que en forrajes fibrosos se tenía baja digestibilidad. Estos forrajes habían sido definidos como materiales de bajo valor nutritivo (Pérez Infante 2010), con altos niveles de FND y efectos en la degradación ruminal. Vergara y Araujo (2006) estudiaron antes este asunto, y aseveraron haber encontrado correlación negativa del material fibroso con la digestión ruminal.

Los resultados con LAB en la ración parecen indicar que se producen mayores cambios en la actividad microbiana ruminal, lo que provoca aumento de la capacidad fermentativa de carbohidratos estructurales, al degradar cadenas carbonatadas complejas y liberar cadenas simples utilizadas por las bacterias celulolíticas, como fuentes de energía para su crecimiento desde sus inicios, unido a la contribución que hicieran los LAB de péptidos y aminoácidos presentes en su proteína verdadera (Elías 1983 y Galina *et al.* 2008a, 2008b, 2009a). Esto se demuestra durante el comportamiento cinético de la curva, donde se observó la actividad estimuladora de LAB,

fraction (A) was the same in all treatments, mainly because the incubated fibrous material was the same (*B. brizantha* hay). This indicator was estimated from the material lost during bag washing, at zero hour, without ruminal incubation. In this regard, it can be stated that the values of potential degradation (A + B) were determined, primarily, by the insoluble, but degradable, fraction (B). This fraction, according to Ortíz *et al.* (2007) in studies developed with grasses, express the permanence time of this type of feed in the rumen, and it is related to the time of adaptation and colonization of microorganisms to degrade this fraction. At the same time, there is a high degradation rate (c) of insoluble fraction (B) with values of 2.9 h<sup>-1</sup>. Similarly, the highest value of effective degradability (ED) of the potentially degradable fraction was determined by the lowest ruminal turnover rate (2% h). In the latter, the effective degradation decreases with the increase of ruminal turnover rate. This confirms the importance of using effective degradation and not the potential one, for calculating diet, as proposed by Leichtle and Cristian (2005).

Regarding the product quality, the minimum content of saturated fatty acids (SFA) was found in the milk of grazing animals, being significantly superior when the probiotic was added. The literature states that a low content of SFA may favor human health because of the information accumulated of the effect of blocking of blood vessels on coronary diseases (Pfeuffer and Schrezenmeir 2000). Results of the present study explain that the feeding system, in general, and specifically free grazing in a silvopastoral system, allows each cow, mainly in forage-diversity areas, to form a diet according to their own needs, which have a good effect on nutritional characteristics of milk, making it favorable for health. The highest content of trans-fatty acids was present in grazing milk. Negative effects of trans-fatty acids on health were considered similar to those reported for saturated fatty acids (Sicchiari, 2008) until recently. Negative effects of trans-fatty acids on coronary pathologies and cytotoxicity were determined from observations on the metabolism of hydrogenated fatty acids, produced during the manufacturing of industrial feeds. Trans derived from processes of ruminal biohydrogenation, like those produced by rumen, have demonstrated positive effects on human health (Wencelová *et al.* 2015). In the present study, this fact was observed for most of C18:1 transvaccenic acids, though the action of 9 desaturation, where it is metabolized in C18: 2 11 trans 9 cis, which represents one of the most important precursor of beneficial CLA (Castillo *et al.* 2013). Therefore, after having this relatively new knowledge, the role of trans fatty acids in the feeding system of ruminants in free grazing have to be reevaluated for producing a “better” milk for the health of the consumer. This fact is a great concern in

quizás asociada a células vivas, más su actividad en el fluido ruminal, desde los inicios de la cinética degradativa y en su extensión (Gutiérrez *et al.* 2012b).

En trabajos de Gutiérrez *et al.* (2012ab), en los que se utilizaron probióticos, la repuesta a las características durante la cinética degradativa de la MS para la fracción soluble (A) fue la misma en todos los tratamientos, debido fundamentalmente a que el material fibroso incubado era el mismo (heno de *B. brizantha*). Este indicador se estimó a partir del material perdido durante el lavado de la bolsa, a la hora cero, sin incubación ruminal. Al respecto, se pudiera argumentar que los valores de la degradación potencial (A+B) estuvieron determinados, básicamente, por la fracción insoluble, pero degradable (B). Esta fracción, según Ortíz *et al.* (2007) en trabajos desarrollados con gramíneas, expresa el tiempo de permanencia de este tipo de alimento en el rumen, y está relacionada con el tiempo de adaptación y colonización de los microorganismos para degradar esta fracción. A la vez que se presenta alta velocidad de degradación (c) de la fracción insoluble (B), con valores de 2.9 h<sup>-1</sup>. De igual manera, el mayor valor de la degradabilidad efectiva (DE) de la fracción potencialmente degradable estuvo determinado por la menor tasa de recambio ruminal (2 % h). En esta última se constató que con el aumento de la tasa de recambio ruminal disminuye la degradación efectiva. Esto reafirma la importancia de utilizar la degradación efectiva, y no la potencial, para el cálculo de la dieta, según lo planteado por Leichtle y Cristian (2005).

Con respecto a la calidad de producto, el contenido mínimo de ácidos grasos saturados (AGS) en la leche procedente de los animales en pastoreo, fue significativamente superior cuando se agregó el probiótico. Se reconoce en la literatura que un menor contenido de AGS parece favorecer la salud humana, debido a la información acumulada sobre el efecto de bloqueo de los vasos sanguíneos en las enfermedades coronarias (Pfeuffer y Schrezenmeir 2000). Los resultados de este trabajo permiten suponer que el sistema de alimentación en general y, en específico el pastoreo libre, en un ambiente silvopastoril, permite que cada vaca, particularmente en la diversidad de forrajes, tenga una dieta de acuerdo con sus necesidades, que tienen efecto en las características nutricionales de la leche, favorable a la salud. El mayor contenido de ácidos grasos trans estuvo en la leche de pastoreo. Hasta hace poco uno de los efectos negativos de los ácidos grasos trans en la salud se consideró similar al informado para los ácidos grasos saturados (Sicchiari 2008). Los efectos negativos de los ácidos grasos trans en patologías coronarias y citotoxicidad, se determinaron a partir de observaciones sobre el metabolismo de los ácidos grasos hidrogenados, producidos durante la manufactura de alimentos industriales. Los trans derivados de los procesos de biohidrogenación ruminal, como los producidos por el rumen, han mostrado efectos positivos en la salud humana (Wencelová *et al.* 2015). En este trabajo se constató, de

Mexico because a big part of the population suffers from obesity or overweight, which may be translated into degenerative chronic diseases, mainly coronary changes (Rubino 2014).

The beneficial effect of omega 3 and omega 6 polyunsaturated acids have been abundantly documented (Colavilla *et al.* 2014). New studies have demonstrated the importance of maintaining a rate lower than 5:1 between omega 6 and omega 3, because superior concentrations block the beneficial effects of omega 3, affecting health (Colavilla *et al.* 2014 y Rubino 2014). Only LAB with 3.48 and SP with 4.79 reached this parameter while grazing supplemented with commercial concentrates is slightly superior (5.54) and the average of 8 commercial milks was 8.40, which means that the little contained omega 3 would have no effect on health because it is blocked by omega 6 (Simopoulos 2002 and Strandvik 2011).

Even though the differences demonstrated between the two systems, omega 3/omega 6 relation and CLA values were favorable for both systems, which demonstrates the importance of biohydrogenation in milk production, which decreases with the use of lactic bacteria. Significant differences in the profile of beneficial fatty acids from the milk of grazing or stabulated animals, with the addition of a supplement of lactic acid bacteria, compared to commercial milk, demonstrates the importance of biohydrogenation in the ruminal metabolism for milk quality and consumer health (Galina *et al.* 2013).

Results of BH with LAB were similar to those obtained in diets supplemented with organic acids or plant with oils (Wencelová *et al.* 2015), which suggests that lactic acid bacteria have a form of ruminal fermentation that may have a similar effect, and results in a better quality of milk (Galina *et al.* 2012). Therefore, several observations have been performed, comparing feeding system in stabulation or grazing with or without the use of lactic bacteria supplementation. The significant differences in the profile of essential fatty acids among the milks of grazing animals, with the addition of lactic bacteria supplementation, compared to commercial milk, demonstrated the importance of BH in ruminal metabolism for milk quality and consumer health. Then, animals from silvopastoral system with supplementation of PF and probiotics were those that produced significantly better quality milk, compared to grazing without probiotics or those stabulated with or without probiotics.

### Conclusions

Results have demonstrated that the two feeding systems in grazing, even if both are mainly composed of fresh green forages, improve the quality of milk probably due to an increase of USFA in diets. Nevertheless, due to the decrease of BH using LAB, there is a production of better quality milk in

hecho, para la mayoría de los C18:1, trans vaccénicos. Esto último mediante la acción de la 9 desaturación, en la que se metaboliza en C18: 2 11 trans 9 cis, que representa uno de los precursores más importantes del ALC benéfico (Castillo *et al.* 2013). Por lo tanto, desde esta perspectiva, la función de los ácidos grasos trans en el sistema de alimentación de los rumiantes en pastoreo libre tiene que ser revaluada en el contexto de producir una leche mejor desde el punto de vista de la salud del consumidor. Este fenómeno en México es una gran preocupación, debido a que una parte significativa de la población sufre de obesidad o sobrepeso, que se traduce en las enfermedades crónico degenerativas, particularmente los trastornos coronarios (Rubino 2014).

El efecto benéfico de los ácidos poliinsaturados omega 3 y omega 6 ha sido abundantemente documentado (Colavilla *et al.* 2014 y Rubino 2014). Estudios recientes han demostrado la importancia de mantener una relación menor a 5:1 entre el omega 6 y el omega 3, ya que concentraciones superiores bloquean los efectos benéficos del omega 3, siendo contraproducentes para la salud (Colavilla *et al.* 2014), solamente LAB con 3.48 y SP con 4.79 cumplen con este parámetro, mientras que el pastoreo suplementado con concentrados comerciales supera ligeramente esta frontera (5.54) y el promedio de 8 leches comerciales es de 8.40. Esto significaría que el poco omega 3 contenido no tendría ningún efecto en la salud, debido a que es bloqueado por el omega 6 (Simopoulos 2002 y Strandvik 2011).

Incluso, a pesar de las diferencias que se demostraron entre los dos sistemas, los valores de ALC y la relación de omega3/omega6 fueron favorables para ambos sistemas. Esto permite demostrar la importancia de la BH en la producción de la leche, que disminuye con el uso de las bacterias lácticas. Las diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos benéficos entre las leches de pastoreo o estabulación con la adición de un suplemento de bacterias lácticas con respecto a la leche comercial demuestra la importancia de la BH en el metabolismo ruminal, especialmente en lo que respecta a la calidad de la leche y la salud del consumidor (Galina *et al.* 2013).

Los resultados sobre BH con LAB fueron similares a los obtenidos en dietas suplementadas con ácidos orgánicos o plantas con aceites (Wencelová *et al.* 2015), lo que permite suponer que las bacterias lácticas tienen una forma de fermentación ruminal que posibilita un efecto similar, que se traduce en mejor calidad de la leche (Galina *et al.* 2012). Para ello se han realizado varias observaciones comparando sistemas de alimentación en estabulación o pastoreo con o sin el uso de suplementos de bacterias lácticas. Las diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos esenciales entre las leches de pastoreo con la adición de un suplemento de bacterias lácticas con respecto a la leche comercial demostraron la importancia de la BH en el metabolismo ruminal para la calidad de la leche y su repercusión en la salud

their profile of essential fatty acids, and a favorable significant difference was observed, even compared to SP ( $P \leq 0.05$ ), which meant that with a decrease of BH due to lactic flora that decreases when there is a substrate with higher diversity of forages, as in the case of animals in LAB.

### Acknowledgements

The authors would like to thank PAPIIT UNAM IT 202014-3 and Cátedra CONS-207 of FES-Cuautitlán UNAM

del consumidor. Desde luego, los animales en sistema silvopastoril con suplementación de PF y probióticos fueron los que produjeron significativamente leche de mejor calidad, con respecto a los que estaban en pastoreo sin probióticos o los que se hallaban en estabulación, con probióticos o sin ellos.

### Conclusiones

Los resultados demostraron que los dos sistemas de alimentación en pastoreo, incluso si ambos se componen principalmente de forrajes frescos verdes, mejoran la calidad de lácteo, probablemente debido al aumento de AGNS de la dieta. No obstante, por la disminución de BH, utilizando LAB, se produce leche de mayor calidad en su perfil de ácidos grasos esenciales. Se constató diferencia significativa favorable, aún al compararla con el SP ( $P \leq 0.05$ ), lo que significó que con una caída de BH, producto de la flora láctica que disminuye cuando existe un substrato de mayor diversidad de forrajes, como fue el caso de los animales en LAB.

### Agradecimientos

Se agradece al PAPIIT UNAM IT 202014-3 y Cátedra CONS-207 de FES-Cuautitlán UNAM IT 202014-3

### References

- Calsamiglia, S., Ferret, A. & Devant, M. 2002. "Effects of pH and pH Fluctuations on Microbial Fermentation and Nutrient Flow from a Dual-Flow Continuous Culture System". *Journal of Dairy Science*, 85 (3): 574–579, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74111-8, PMID: 11949862, 11949862.
- Castaneda, A. Díaz, L. H., Muro, A., Gutiérrez, D. V., Lozana, A. R. & Ortiz, U. 2010. Parámetros de formación en ovinos y caprinos sometidos a cambios de dietas, VI Congreso de Producción Animal Tropical. I Simposio FOCAL, La Habana. ISBN: 978-959- 7171-31-6
- Castillo, C. Y. 2009. Fermentación *in vitro* para obtener la levadura *Candida norvegensis* en mezcla de alfalfa con bagazo de manzana fermentado y sus efectos sobre la actividad microbiana ruminal. Ph.D. Thesis, Universidad Autónoma de Chihuahua, México.
- Castillo, V. J., Olivera, A. M. & Carulla, F. J. 2013. "Description of the biochemistry mechanism of polyunsaturated fatty acid ruminal biohydrogenation: a review". *Revista U.D.C.A Actualidad; Divulgación Científica*, 16 (2): 459–468, ISSN: 0123-4226.
- Colavilla, G., Amadoro, C. & Mignogna, R. 2014. "Rapporto omega6/omega3 e GPA nell'LatteNobile in Molise". In: Rubino R., *Il Modello LatteNobile: Un'altra via è possibile*, Italia: Caseus, pp. 118–128, Available: <[https://aperto.unito.it/retrieve/handle/2318/149692/26118/Cavallero\\_Lombardi-Paesaggi%20agrari%2c%20polifitismo%20e%20alimentazione%20animale%20Anfosc-def.pdf](https://aperto.unito.it/retrieve/handle/2318/149692/26118/Cavallero_Lombardi-Paesaggi%20agrari%2c%20polifitismo%20e%20alimentazione%20animale%20Anfosc-def.pdf)>, [Consulted: April 4, 2016].
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals feed on molasses-urea diet. Ph.D. Thesis, Universidad Aberdeen, Escocia, 180 p.
- Elías, A. 1983. "Digestión de pastos y forrajes tropicales". In: *Los pastos en Cuba*, vol. 2, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, pp. 187–246, Available: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=catalco.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=030111>>, [Consulted: March 2, 2016].
- Elías, A., Chilibroste, P., Michelena, J. B., Iriñiz, J. & Rodríguez, D. 2010. Evaluación de ACTIVIOL y MEBA con ensilaje de sorgo y despunte de caña de azúcar: valor nutritivo, fermentabilidad *in vivo* e *in vitro* y pruebas con animales en crecimiento y vacas lecheras. Potencial de uso de forrajes de baja calidad en la alimentación de rumiantes, con énfasis en subproductos de la caña de azúcar, República de Uruguay.
- Elías, A. & Herrera, F. R. 2008. "El VITAFERT en el tracto gastro-intestinal". In: *Producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de microorganismos benéficos activados (MEBA)*, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, p. 8.
- Flores, M. N. 2000. Elaboración de cultivos microbianos a partir de coco, su utilización en dietas para borregos en engorde. M.Sc. Thesis, Instituto Nacional de Nutrición, Salvador Zubiran, México.
- Galina, M. A., Delgado, P. M., Ortiz, R. M. A., Pineda, L. J. & Puga, D. C. 2009a. "Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido-lácticas". *Pastos y Forrajes*, 32 (4): 1–1, ISSN: 0864-0394.
- Galina, M. A., Guerrero, M., Puga, C. D. & Haenlein, G. F. W. 2004a. "Effects of slow-intake urea supplementation on goat kids pasturing natural Mexican rangeland". *Small Ruminant Research*, 55 (1): 85–95, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2003.09.011.

- Galina, M. A., Guerrero, M., Puga, C. & Haenlein, G. F. W. 2004b. "Effect of a slow-intake urea supplementation on growing kids fed corn stubble or alfalfa with a balanced concentrate". *Small Ruminant Research*, 53 (1–2): 29–38, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2003.08.009.
- Galina, M. A., Guerrero, M., Serrano, G., Morales, R. & Haenlein, G. F. W. 2000. "Effect of complex catalytic supplementation with non-protein nitrogen on the ruminal ecosystem of growing goats pasturing on shrub land in Mexico". *Small Ruminant Research*, 36 (1): 33–42, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/S0921-4488(99)00115-7.
- Galina, M. A., Hummel, J. D., Sánchez, M. & Haenlein, G. F. W. 2004c. "Fattening Rambouillet lambs with corn stubble or alfalfa, slow intake urea supplementation or balanced concentrate". *Small Ruminant Research*, 53 (1–2): 89–98, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2003.08.008.
- Galina, M. A., Ortiz, R. M. A., Delgado, P. M. & Pineda, L. J. 2007a. "Effect of a lactic probiotic supplementation on goat kids growth". In: XII Seminar of the sub-NY FAO- CIHEAM on Sheep and Goat Nutrition, Thessaloniki, Greece, p. 11.
- Galina, M. A., Ortiz, R. M. A. & Guerrero, M. 2007b. "Desarrollo de cabras con o sin suplementación, con un probiótico de bacterias lácticas". In: V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Universidad Juan Agustín Maza y Universidad de Buenos Aires, p. 11.
- Galina, M. A., Ortiz, R. M. A., Guerrero, M. & Elías, A. 2008a. "Efecto de un ensilado de maíz solo o inoculado con probióticos lácticos y adicionado con un suplemento nitrogenado de lento consumo en ovinos". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12 (2): 23–34, ISSN: 0188-7890.
- Galina, M. A., Ortiz, R. M. A., Guerrero, M., Mondragón, D. F., Franco, N. J. L. & Elías, A. 2008b. "Engorda de ovinos con silo de maíz, silo inoculado con un probiótico láctico, solo o adicionado con un suplemento de liberación lenta de nitrógeno". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12 (2): 23–24, ISSN: 0188-7890.
- Galina, M. A., Ortiz-Rubio, M. A., Mondragón, F., Delgado-Pertíñez, M. & Elías, A. 2009b. "Rendimiento de terneros alimentados con silo de maíz o láctico con un promotor de la fermentación ruminal". *Archivos de Zootecnia*, 58 (223): 383–393, ISSN: 0004-0592.
- Galina, M. A., Pérez-Gil, F., Ortiz, R. M. A., Hummel, J. D. & Ørskov, R. E. 2003. "Effect of slow release urea supplementation on fattening of steers fed sugar cane tops (*Saccharum officinarum*) and maize (*Zea mays*): ruminal fermentation, feed intake and digestibility". *Livestock Production Science*, 83 (1): 1–11, ISSN: 0301-6226, DOI: 10.1016/S0301-6226(03)00045-9.
- Galina, M. A., Ruiz, G. & Ortiz, M. A. 2002. "Ceba de bovinos con punta de caña y planta de maíz suplementados con bloque proteico de urea o concentrado". *Pastos y Forrajes*, 25 (3): 209–221, ISSN: 2078-8452.
- Galina, M., Guerrero, M., Pineda, J., Ortiz, M. & Osnaya, F. 2012. "Efecto de la biohidrogenación ruminal de probióticos lácticos, en la engorda de bovinos". In: XXXVI Congreso Nacional de Buiatría, Yucatán, México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A. C., pp. 753–761.
- Galina, M., Guerrero, M., Pineda, J., Ortiz, M. & Osnaya, F. 2013. "Efecto de la biohidrogenación ruminal de probióticos lácticos, en la engorda de bovinos". In: XXXVII Congreso Nacional de Buiatría, Guerrero, México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A. C., pp. 533–538.
- Galina, M., Pineda, L. J. & Morales, R. 2010. "Suplementación en pastoreo de cabras lecheras con una fuente de liberación lenta de nitrógeno (SLNN) con o sin la adición de un probiótico de bacterias lácticas". In: III Congreso de Producción Animal Tropical y I Simposio FOCAL, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, ISBN: 978-959-7171-31-7.
- Galindo, J. & Marrero, Y. 2005. "Manipulación de la fermentación microbiana ruminal". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39 (especial): 439–450, ISSN: 2079-3480.
- Gutiérrez, B. R. 2005. Actividad probiótica de un producto biofermentado (VITAFER), en pollos de ceba. M.Sc. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 52 p.
- Gutiérrez, D., Elías, A., Galina, M., García, R., Herrera, F., Jordán, H. & Sarduy, L. 2012a. "Efecto del aditivo VITAFERT en el consumo de la materia seca y fibra en detergente neutro de cabras alimentadas con heno de *Brachiariabrizanta*". In: II Foro internacional de Ciencia e Innovación Tecnológica, Colima, México: Puertabierta Editores, pp. 318–322, ISBN: 978-607-95853-7-2.
- Gutiérrez, D., Elías, A., Galina, M., García, R., Herrera, F., Jordán, H. & Sarduy, L. 2012b. "Influencia de un aditivo microbiano en el consumo voluntario de materia seca e indicadores de la fermentación ruminal en cabras alimentadas con heno de *Brachiariabrizanta*". In: II Foro internacional de Ciencia e Innovación Tecnológica, Colima, México: Puertabierta Editores, pp. 312–317, ISBN: 978-607-95853-7-2.
- Hartfoot, C. G. & Hazlewood, G. P. 1997. "Lipid metabolism in the rumen". In: Hobson P. N. & Stewart C. S., *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd ed., New York, USA: Blackie Academic & Professional, pp. 382–426, ISBN: 978-94-009-1453-7.
- Herrera, J. A., Shahabuddin, A. K. M., Faisal, M., Ersheng, G., Wei, Y., Lixia, D., Gandaho, T. & Jaramillo, P. L. 2004. "Efectos de la suplementación oral con calcio y ácido linoleico conjugado en primigrávidas de alto riesgo". *Colombia Médica*, 35 (1): 31–37, ISSN: 1657-9534.
- Jarrige, R. 1995. *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion*. Editions Quae, 932 p., ISBN: 978-2-7380-0629-5, Available: <[https://books.google.com/cu/books?id=pIbmTs7\\_DDIC&redir\\_esc=y](https://books.google.com/cu/books?id=pIbmTs7_DDIC&redir_esc=y)>, [Consulted: April 4, 2016].
- Jin, G. L., Choi, S. H., Lee, H. G., Kim, Y. J. & Song, M. K. 2008. "Effects of monensin and fish oil on conjugated linoleic acid production by rumen microbes in Holstein cows fed diets supplemented with soybean oil and sodium bicarbonate". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21: 1728–1735, ISSN: 1976-5517, 1011-2367.
- Khanal, R. C. 2004. "Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17 (9): 1315–1328, ISSN: 1976-5517, 1011-2367.
- Krause, K. M. & Oetzel, G. R. 2006. "Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review".

- Animal Feed Science and Technology, 126 (3–4): 215–236, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004.
- Ku, V. J. C. 2010. “Requerimientos de energía en rumiantes en el trópico. Implicaciones del concepto de mantenimiento. Taller de fisiología y procesos fermentativos”. In: III Congreso de Producción Animal Tropical y I Simposio FOCAL, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, ISBN: 978-959-7171-31-7.
- Leichtle, S. & Cristian, J. 2005. Degradabilidad ruminal de henos de praderas de la zona sur de Chile. Graduate Theses, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Chile, 18 p.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Ysui, T., Kutokawa, Y., Kanda, S. & Itabashi, H. 2004. “Effects of *Saccharomyces cerevisiae* twin of live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro”. *Journal of Dairy Science*, 82: 1847–1854, ISSN: 0022-0302.
- López, R. J. 2009. Efecto de la suplementación con concentrado en indicadores de la fisiología digestiva y consumo de nutrientes en becerros (*Bubalus bubalis*) alimentados con pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 140 p.
- Marrero, Y. R. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 104 p.
- Newbold, C. J., López, S., Nelson, N., Ouda, J. O., Wallace, R. J. & Moss, A. R. 2005. “Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro”. *British Journal of Nutrition*, 94 (01): 27–35, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN20051445.
- Offner, A., Bach, A. & Sauvant, D. 2003. “Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen”. *Animal Feed Science and Technology*, 106 (1–4): 81–93, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(03)00038-5.
- Ørskov, E. R. & McDonald, I. 1979. “The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage”. *The Journal of Agricultural Science*, 92 (2): 499–503, ISSN: 0021-8596.
- Ortiz, R. A., Haenlein, G. F. W. & Galina, M. 2001. “Effects on feed intake and body weight gain when substituting maize with sugar cane in diets for Zebu steers complemented with slow release urea supplements”. *International Journal Animal Science*, 16: 239–245.
- Ortiz, R. M. A., Galina, M. A. & Carmona, M. M. A. 2002. “Effect of a slow non-protein nitrogen ruminal supplementation on improvement of *Cynodon nlemfuensis* or *Brachiaria brizanta* utilization by Zebu steers”. *Livestock Production Science*, 78 (2): 125–131, ISSN: 0301-6226, DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00089-1.
- Ortiz, R. M. A., Ørskov, E. R., Milne, J. & Galina, H. M. A. 2007. “Effect of different sources of nitrogen on in situ degradability and feed intake of Zebu cattle fed sugarcane tops (*Saccharum officinarum*)”. *Animal Feed Science and Technology*, 139 (3–4): 143–158, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.01.016.
- O’Shea, M., Lawless, F., Stanton, C. & Devery, R. 1998. “Conjugated linoleic acid in bovine milk fat: a food-based approach to cancer chemoprevention”. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (5): 192–196, ISSN: 0924-2244, DOI: 10.1016/S0924-2244(98)00036-3.
- Pérez, I. F. 2010. “Estimado de la calidad del pasto y los forrajes verdes cuando la disponibilidad no es limitante”. In: *Ganadería del Futuro Producción y Eficiencia*, La Habana, Cuba: Palcogra, p. 33.
- Peters, M., van der Hoek, R. & Schultze, K. R. 2010. “Los pastos y forrajes en el trópico - retos en el marco de un desarrollo sostenible”. In: III Congreso de Producción Animal Tropical, V Foro Latinoamericano de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, ISBN: 978-959-7171-31-7.
- Pfeuffer, M. & Schrezenmeier, J. 2000. “Bioactive substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular diseases”. *British Journal of Nutrition*, 84 (S1): 155–159, ISSN: 0007-1145, 1475-2662.
- Puga, D. C., Galina, H. M., Pérez-Gil, R. F., Sanginés, G. L., Aguilera, B. A. & Haenlein, G. F. W. 2001a. “Effect of a controlled-release urea supplement on rumen fermentation in sheep fed a diet of sugar cane tops (*Saccharum officinarum*), corn stubble (*Zea mays*) and King grass (*Pennisetum purpureum*)”. *Small Ruminant Research*, 39 (3): 269–276, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/S0921-4488(00)00196-6.
- Puga, D. C., Galina, H. M., Pérez-Gil, R. F., Sanginés, G. L., Aguilera, B. A., Haenlein, G. F. W., Barajas, C. R. & Herrera, H. J. G. 2001b. “Effect of a controlled-release urea supplementation on feed intake, digestibility, nitrogen balance and ruminal kinetics of sheep fed low quality tropical forage”. *Small Ruminant Research*, 41 (1): 9–18, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/S0921-4488(01)00171-7.
- Puga, D. C., Galina, M. A., Pérez, G. F., Rosado, J. & Murillo, J. C. 2001c. “Efecto de un Alimento Complejo Catalítico sobre el pH, amoníaco (N-NH<sub>3</sub>) ruminal y la desaparición in situ de *Cynodon nlemfuensis*, *Cynodon dactylon*, *Panicum maximum* y *Brachiaria brizanta* en bovinos en Pastoreo en el Trópico Mexicano”. *Pastos y Forrajes*, 24 (2): 157–166, ISSN: 0864-0394, 2078-8452.
- Ramírez, O. R., Ramírez, L. R. G. & López, G. F. 2002. “Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad”. *Ciencia UANL*, 5 (2): 180, ISSN: 1405-9177.
- Ramos, N. & Antonio, J. 2009. “Acidosis Ruminal y su Relación con la Fibra de la Dieta y la Composición de Leche en Vacas Lecheras”. In: *Seminario Avanzado de investigación Cajamarca, Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (Sirives)*, pp. 2–3, Available: <[http://www.uv.mx/personal/rloeza/files/2013/12/acidosis\\_nino.pdf](http://www.uv.mx/personal/rloeza/files/2013/12/acidosis_nino.pdf)>, [Consulted: April 4, 2016].
- Rubino, R. 2014. *Il Modello Latte Nobile: Un'altra via è possibile*. Italia: Caseus, 191 p., Available: <[https://aperto.unito.it/retrieve/handle/2318/149692/26118/Cavallero\\_Lombardi-Paesaggi%20agrari%2c%20polifitismo%20e%20alimentazione%20animale%20Anfosco-def.pdf](https://aperto.unito.it/retrieve/handle/2318/149692/26118/Cavallero_Lombardi-Paesaggi%20agrari%2c%20polifitismo%20e%20alimentazione%20animale%20Anfosco-def.pdf)>, [Consulted: April 4, 2016].
- Secchiari, P. L. 2008. “Nutritional and nutraceutical value of foods of animal origin”. *Italian Journal of Agronomy*, 3 (1): 73–101, ISSN: 1125-4718.

- Shen, X., Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G. & Zhao, R. 2011. "Trans-18:1 and CLA Isomers in Rumen and Duodenal Digesta of Bulls Fed n-3 and n-6 PUFA-Based Diets". *Lipids*, 46 (9): 831–841, ISSN: 0024-4201, 1558-9307, DOI: 10.1007/s11745-011-3586-5.
- Simopoulos, A. P. 2002. "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56 (8): 365–379, ISSN: 0753-3322, PMID: 12442909.
- Smith, R. H. 1975. "Nitrogen metabolism in the rumen and the composition and nutritive value of nitrogen compounds entering the duodenum". In: McDonald I. W. & Warner A. C. I. (eds.), *Digestion and metabolism in the ruminant.*, Armidale, Australia: University of New England Publishing Unit., pp. 399–415, ISBN: 978-0-85834-086-2, Available: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19770435059.html;jsessionid=0B0DDBB9D51103DD61E748465DE71236>>, [Consulted: April 4, 2016].
- Strandvik, B. 2011. "The omega-6/omega-3 ratio is of importance!". *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 85 (6): 405–406, ISSN: 0952-3278, DOI: 10.1016/j.plefa.2011.09.001.
- Tittonell, P., Rufino, M. C., Janssen, B. H. & Giller, K. E. 2009. "Carbon and nutrient losses during manure storage under traditional and improved practices in smallholder crop-livestock systems—evidence from Kenya". *Plant and Soil*, 328 (1-2): 253–269, ISSN: 0032-079X, 1573-5036, DOI: 10.1007/s11104-009-0107-x.
- van Soest, P. J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant. Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers.* Oregon: O & B Books, Inc., 24 p., ISBN: 978-0-9601586-0-7, Available: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19821437561.html>>, [Consulted: April 4, 2016].
- Vergara, L. J. & Araujo, F. O. 2006. "Producción, composición química y degradabilidad ruminal *in situ* de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick en el bosque seco tropical". *Revista Científica*, 16 (3): 239–248, ISSN: 0798-2259.
- Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihaliková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D. & Kišidayová, S. 2015. "Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants". *Small Ruminant Research*, 125: 64–72, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2015.01.028.
- Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C. & Troegeler-Meynadier, A. 2013. "Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation". *Journal of Dairy Science*, 96 (1): 451–459, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2012-5690.

**Received: July 15, 2015**