



Artículo de investigación

Reducción de metano *in vitro* con el glucósido cianogénico Linamarina

Carmen Zavaleta C^{1*} M.Sc; Carla Orellana M¹ M.Sc; Nelson Vera A³ M.Sc;
Hector Manterola B¹ M.Sc; Giorgio Castellaro G¹ M.Sc; Víctor H. Parraguez G¹⁻² Ph.D.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Producción Animal, Santiago, Chile.

²Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Avenida. Santa. Rosa, 11735, Santiago, Chile.

³Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Ciencia Animal, Vicente Méndez 595, Chillán. Chile.

*Correspondence: carmel_ita_1@hotmail.com

Recibido: Febrero 2019; Aceptado: Mayo 2019; Publicado: Agosto 2019.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de dosis crecientes del glucósido cianogénico Linamarina, en la reducción de metano ruminal *in vitro*. **Materiales y Métodos.** Se empleó líquido ruminal de dos ovejas fistuladas de la raza Merino Precoz, con el que se inoculó un sustrato fermentativo constituido por heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y grano de avena molido (*Avena sativa L.*), se adicionó solución buffer y Linamarina (pureza de $\geq 98\%$) en dosis crecientes, lo que se llevó a incubación por ocho horas *in vitro*. El metano se midió cada hora, con un monitor de gases infrarrojo. **Resultados.** De acuerdo con el incremento de las dosis de Linamarina (0, 6, 13, 20 y 26 mg/L), la concentración de metano disminuyó de forma lineal ($p \leq 0.05$) en (9.7, 9.2, 18.1 y 29.4%) respectivamente. Se observó una reducción significativa de metano con la dosis más alta de Linamarina. **Conclusión.** La Linamarina, en su estado puro, fue eficaz en la reducción de metano durante la fermentación ruminal *in vitro*. Por lo tanto, este estudio constituye una base para futuros experimentos que incluyan fuentes vegetales de Linamarina y otras variables ruminales, lo que puede conducir a encontrar estrategias para reducir los gases de efecto invernadero.

Palabras clave: Aditivo alimentario, fermentación ruminal, producción de metano (*Fuente: Tesaurus de la biblioteca nacional de agricultura*).

ABSTRACT

Objective. To assess the effect of rising doses of the cyanogenic glucoside Linamarin on the reduction of *in vitro* rumen methane. **Materials and methods.** Rumen fluid from two fistulated Merino Precoz sheep, inoculated with a fermentation substrate comprising alfalfa hay (*Medicago sativa*) and ground oat grain (*Avena sativa L.*), and added with buffer solution and Linamarin (purity $\geq 98\%$) in rising doses, was incubated for eight hours *in vitro*. Methane was measured each hour with an infrared gas monitor. **Results.** According Linamarin doses were increased (0, 6, 13, 20 and 26 mg/L), the methane concentration fell in a linear manner ($p \leq 0.05$) by (9.7, 9.2, 18.1 and 29.4%), respectively. A significant reduction of methane was seen with the highest dose of Linamarin. **Conclusions.** Linamarin, in pure state, was effective to reduce methane during *in vitro* ruminal fermentation. Therefore, this study constitutes a basis for future experiments including vegetable sources of Linamarin as well as other rumen variables, leading to find a strategy for reducing greenhouse gases.

Keywords: Food additive, methane production, rumen fermentation (*Source: Thesaurus of the National Library of Agriculture*).

Como citar (Vancouver).

Zavaleta CC, Orellana MC, Vera AN, Manterola BH, Castellaro GG, Parraguez GP. Reducción de metano *in vitro* con el glucósido cianogénico Linamarina. Rev MVZ Córdoba. 2019; 24(3):7291-7296. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1526>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2019. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

INTRODUCCIÓN

El aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera (1) ha acelerado los procesos de cambio climático (2). Los principales GEI son dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), los que han aumentado en un 40, 150 y 20%, respectivamente, desde 1990 (3).

En relación al CH₄, se estimó que las emisiones totales provenientes del ganado rumiante en 2014, fueron alrededor de 97.1 millones de toneladas (1), lo que constituyó el 18% del total de CH₄ vertido al medio ambiente (4).

Durante el proceso digestivo los ruminantes generan CH₄ formado por bacterias metanógenas (5), que se expulsa a través del eructo (6,7), que tiene un impacto ambiental y constituye una pérdida de energía para el animal del orden del 5 al 12% (6). Sin embargo, las emisiones de CH₄ podrían reducirse mediante el mejoramiento sanitarios, el manejo del rebaño, la dieta o con la inclusión de metabolitos secundarios de plantas (MSP) (5).

Existen diferentes MSP como los taninos condensados (TC), aceites esenciales (AE) y glucósidos cianogénicos (GC), con diferentes mecanismos de acción, que les permite reducir la generación de CH₄ en el rumen (8,9). Estos MSP son compuestos químicos sintetizados por la propia planta (5) y el mecanismo principal relacionado con la disminución de la metanogénesis es la modificación de la actividad antimicrobiana (7).

La acción reductora de la producción de CH₄ de los TC y AE se ha demostrado ampliamente con resultados favorables. En este sentido, cuando se incorporó un 20% de *Amaranthus spinosus* (planta que contiene TC) en el sustrato de un ensayo de fermentación *in vitro*, se obtuvo una reducción del 26% de CH₄ (10). Además, cuando se utilizaron AE de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), tomillo blanco (*Thymus mastichina*) y anís (*Pimpinella anisum*), el CH₄ se redujo en 37, 76 y 32% respectivamente (8). Del mismo modo, cuando se utilizó AE de clavo de olor en dosis de 200 mg, el CH₄ se redujo 84.21, 69.49, y 80.34% respectivamente (9), cuando el sustrato era una dieta mixta, concentrado y heno, respectivamente, demostrando el efecto que tienen los MSP como reductores de CH₄.

La Linamarina es un tipo de GC, que se encuentra principalmente en la yuca (*Manihot esculenta* Cranz), con mayor concentración en las variedades amargas. Se ha observado que el uso de la yuca en condiciones *in vitro* tiene un efecto antimetánogénico (11). Al analizar las concentraciones de Linamarina en la corteza de yuca, se encontraron 28.40±3.38

g/kg de peso seco y 7.71±0.97 g/kg en peso fresco, mientras que en el parénquima de yuca se encontró 14.71±1.91 y 5.77±0.74 g/kg en forma seca y fresca respectivamente (12). El efecto de la yuca sobre la reducción de CH₄ en la fermentación *in vitro*, se demostró con la inclusión de 12 mg MS de raíz y hoja de yuca. La producción de CH₄ fue 70.50±1.32 y 65.70±1.32 mL/g de MS digerida de hoja y raíz de yuca respectivamente, mientras que cuando no se incluyó la yuca, la producción de CH₄ fue de 74.2±1.32 mL/g de MS digerida (13).

La Linamarina, tiene el potencial para reducir la producción de CH₄ en los ruminantes, cuando se usan las dosis adecuadas. Sin embargo, el efecto de la inclusión de diferentes dosis de Linamarina pura *in vitro* es poco conocido. El objetivo del estudio fue cuantificar los efectos de incluir dosis crecientes de Linamarina sobre la concentración de CH₄ a diferentes tiempos, durante la fermentación ruminal *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de animales. Se dispuso de 2 ovejas de la raza Merino Precoz, de cuatro años, a las cuales le fueron instaladas fístulas ruminales en el año 2014, de acuerdo con el protocolo del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Estas se manejaron en la sección de Rumiantes Menores y Pastizales del Secano de la Estación Experimental Germán Silva, que pertenece a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la comuna de Maipú, Región Metropolitana, Chile (Lat. 33° 28'S y Long. 70° 51'W; 470 m.s.n.m.). El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Producción Animal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

Dieta. Durante el periodo del ensayo, las ovejas fueron alimentadas con 1.2 kg de heno de alfalfa y 300 g de grano de avena por animal por día, distribuido en dos raciones, una entregada en la mañana y otra en la tarde. En la tabla 1, se presenta la composición nutricional de la dieta suministrada y los insumos que fueron empleados como sustratos fermentativos (SF), para la incubación.

Tabla 1. Composición bromatológica de la dieta suministrada y sus componentes.

	MS (%)	FDN (%)	FDA (%)	PC (%)	Energía (Mcal/kg MS)
Heno de Alfalfa	92.84	49.33	38.09	16.66	2.21
Grano de Avena	89.89	28.69	13.79	11.06	2.72
Dieta	91.37	39.01	25.94	13.86	2.50

MS: Materia Seca, FDN: Fibra Detergente Neutra, FDA: Fibra Detergente Ácida, PC: Proteína Cruda, (Mcal/kg MS) Megacalorías por kilogramo de MS.

Recolección de líquido ruminal (LR). En cada día de incubación, la recolección de LR se realizó por la mañana, en condición preprandial. Se recolectaron dos litros durante los tres días de incubación. El LR se filtró con un paño de algodón de doble capa, se almacenó en un recipiente inserto en un termo con agua a 39°C, con el fin de mantener una temperatura estable para ser transportado al laboratorio y llevar a cabo la inoculación.

Diseño experimental. El estudio fue de medidas repetidas con un factor y cinco niveles, donde se probó Linamarina (pureza $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich Chemical, Darmstadt, Alemania, Cat. No. 68264-50 mg) en cinco dosis diferentes (0, 6.0, 13.0, 20.0 y 26.0 mg/L). Cada dosis representó un tratamiento. En cada tratamiento, se agregó LR y la dosis respectiva de Linamarina, se incubó *in vitro* en 5 tubos de ensayo (repeticiones), midiendo la concentración de CH₄ cada hora, durante 8 horas de incubación. Este protocolo se repitió en tres días consecutivos.

Inoculación. Se empleó la técnica *in vitro* descrita por Theodorou et al (14). Se utilizaron 25 tubos de ensayo de 100 mL, provistos de tapón de goma con válvula Bunsen. En cada tubo se colocó el SF que consistió en 0.5 g de heno de alfalfa y 0.5 g de grano de avena molidos a 1 mm, en un molino tipo Wiley. A cada tubo de ensayo se le añadió 30 mL de LR y 40 mL de solución buffer. La composición de la solución buffer fue: 238 mL de solución macromineral (5.7 g Na₂HPO₄ + 6.2 KH₂PO₄ + 0.6 g MgSO₄·7H₂O + agua destilada 1 L) más 238 mL de solución tampón de fosfato (35 g NaHCO₃ + 4 g NH₄HCO₃ + agua destilada 1 L, pH 7.0) en 1 L de agua destilada (15).

Incubación. Los tubos se ordenaron en gradillas y puestos en una cámara termostática (Memmert, modelo 854, Alemania) a 39°C, por un periodo de ocho horas consecutivas. La temperatura se mantuvo monitoreada constantemente y los tubos se mantuvieron con movimientos rotatorios.

Mediciones de CH₄. Este procedimiento se llevó a cabo cada una hora durante ocho horas consecutivas, utilizando un monitor de gases RKI Eagle 2 (RKI instruments, California, EE. UU.). Dicho monitor es un instrumento de alta precisión, que utiliza un sensor de conductividad térmica (infrarrojo), capaz de detectar concentraciones variables de CH₄, dentro en un rango de 0 a 50.000 ppm.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza, con el programa Statgraphics 5.0. Los datos tuvieron distribución normal. No hubo diferencias al comparar los datos

entre días de incubación, entonces los datos de los diferentes días se analizaron en conjunto. Los datos fueron analizados por tiempo, tratamiento y la interacción tiempo vs tratamiento. Cuando fue pertinente, las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0.05$. Los datos se presentan en promedio grupal \pm SEM. Adicionalmente, se realizaron contrastes polinomiales para determinar efectos lineales o cuadráticos.

RESULTADOS

Reducción de la concentración de CH₄. La tabla 2 muestra los promedios generales de concentraciones de CH₄, de acuerdo con cada dosis de Linamarina, el efecto lineal y cuadrático, así como la significancia de los tratamientos, el tiempo de fermentación y la interacción tiempo vs tratamiento.

Tabla 2. Medias de la concentración de CH₄ con dosis crecientes de Linamarina en la fermentación ruminal *in vitro*.

	Tratamiento (LIN concentración mg/L)					
	0	6	13	20	26	
CH ₄ (ppm)	2738 ^a	2472 ^a	2485 ^a	2243 ^{ab}	1932 ^b	
EEM ¹	P ²		P ³			
	T	H	T*H	L	Q	
	154.2	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.015

^{a, b} Medias con diferentes letras son diferentes ($p \leq 0.05$). ¹EEM, Error estándar de la media; ²Probabilidad de diferencias entre tratamientos (T), horario de muestreo (H) e interacción (T*H); ³Probabilidad lineal (L) o cuadrática (Q) para la concentración de LIN..

Las reducciones de CH₄ en relación con las dosis (6, 13, 20, 26 mg/L) fueron de 9.7, 9.2, 18.1 y 29.4%, respectivamente. Al regresar los valores de la concentración de CH₄ en función de los tratamientos se obtuvo efecto lineal significativo ($p=0.002$) y cuadrático ($p=0.015$) en la reducción de CH₄ con dosis crecientes de Linamarina.

El análisis de los datos por tiempo de incubación muestra una reducción ($p \leq 0.05$) de la concentración de CH₄ (Figura 1), donde las horas 1, 2 y 3 fueron las más altas ($p \leq 0.05$), pero similares entre ellas. Una disminución significativa comenzó a partir de la hora 4 de incubación, con una concentración de CH₄ de 3.480 ± 20 ppm; este valor fue similar al de la hora 5. Se obtuvieron concentraciones más bajas de CH₄ a la hora 6 y 7 de incubación, con valores de 1.218 ± 20 y 1.494 ± 20 ppm, respectivamente. La hora 8 fue la más baja en CH₄ con una concentración de 840 ± 20 ppm. Al regresar los valores de la concentración de CH₄ en función del tiempo se obtuvo una relación decreciente lineal significativa ($R^2=0.843$; $p \leq 0.001$).

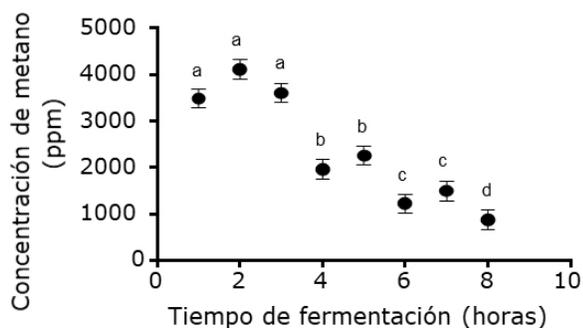


Figura 1. Reducción de la concentración de metano durante ocho horas de fermentación *in vitro* con linamarina.

Se obtuvo una interacción ($p \leq 0.005$) entre el tiempo de incubación y los tratamientos. El valor más bajo de la concentración de CH_4 se obtuvo con la dosis más alta de Linamarina en la hora 1. En este tiempo, la concentración de CH_4 fue aumentando cuando las dosis de Linamarina iban disminuyendo (Figura 2), mostrando un efecto de dosis/respuesta. Sin embargo, después de 2 horas de fermentación, se observó un patrón de reducción de CH_4 similar durante el resto del tiempo de fermentación.

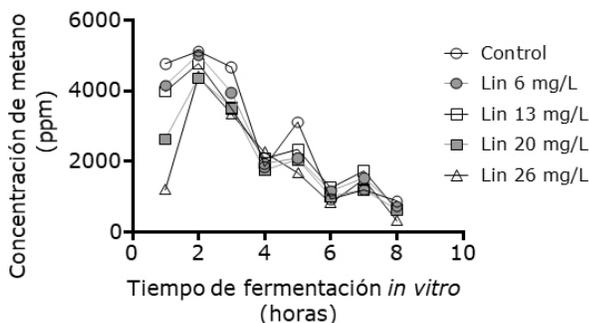


Figura 2. Efecto de cinco dosis de linamarina en la producción de CH_4 durante ocho horas de fermentación *in vitro*.

DISCUSIÓN

No se encontraron estudios en la literatura sobre el uso y la dosificación de Linamarina pura en la reducción de CH_4 . Como se mencionó anteriormente, Linamarina es un MSP presente en la yuca. Las concentraciones de Linamarina en yuca fluctúan según la variedad, el lugar, la edad de la planta, el tiempo de cosecha y la forma en que se suministra en las dietas. En un análisis reportado, se encontraron 538.4 ± 4.91 mg de Linamarina en 100g de MS de yuca, mientras que se obtuvieron 102.3 ± 0.93 mg de Linamarina de 100 mL de mezcla acuosa, por lo tanto, es importante considerar la forma en que se ofrece la yuca, cuando debe suministrarse una dosis específica de Linamarina (16).

Se ha demostrado que el uso de variedades amargas de yuca como aditivo alimentario reduce las concentraciones de CH_4 . En este sentido, Phuong et al (11) obtuvieron una reducción del 50 % de CH_4 en un ensayo de fermentación *in vitro* de 24 horas cuando se incluyeron 2.16 g/MS de hojas de yuca amarga. Hemos estimado la cantidad de Linamarina incluida en el experimento descrito anteriormente, de acuerdo con Maherawati et al (16), aunque estos autores no informaron la variedad de yuca utilizada para el análisis. Por lo tanto, la inclusión de yuca amarga tuvo un equivalente a 11.62 mg de Linamarina. Luego, los resultados de Phuong et al (11) son similares a los resultados obtenidos en el presente estudio, con la dosis de 13 mg/L de Linamarina pura. Otros resultados reportados por Inthapaya y Preston (17), muestran que cuando se adicionaron 12 g/MS de harina de hoja de yuca, con un equivalente de 64 mg/Linamarina, se obtuvieron los valores más bajos de CH_4 , con una reducción del 35.5% de CH_4 a las 24 Horas de fermentación *in vitro*. Este porcentaje de reducción es mayor que la reducción máxima obtenida en nuestro estudio. Sin embargo, la inclusión de Linamarina utilizada por Inthapaya y Preston (17) fue aproximadamente 2 veces mayor que la dosis máxima utilizada en nuestro experimento, lo que confirma el efecto dosis/respuesta de Linamarina sobre la reducción de CH_4 en la fermentación ruminal *in vitro*.

Los hallazgos de esta investigación muestran que las cuatro dosis de Linamarina tuvieron una respuesta lineal en la reducción de las concentraciones de CH_4 . Este resultado se relaciona principalmente con la forma en que se usó Linamarina, ya que tener una pureza ≥ 98 % lo hace altamente disponible para los microorganismos del rumen. En este sentido, cuando Do et al (18) utilizaron hojas de yuca como sustrato, más harina de raíz de yuca como aditivo, equivalente a 10.76 mg/ Linamarina, obtuvieron CH_4 32.2 mL/g de sustrato, mientras que cuando no incluyeron aditivo, se obtuvo CH_4 43.5 mL/g de sustrato. Además, la adición de harina de raíz de yuca al sustrato conduce a reducir la producción total de gas de 237 mL a 197 mL.

La regresión del tiempo de incubación vs la concentración de CH_4 muestra que la adición de Linamarina en la incubación con LR de ovejas presenta una tendencia a reducir la concentración de CH_4 . Los MSP tienen un período de acción que puede variar dependiendo de las dosis suministradas, la dieta del animal (principalmente) y la capacidad antimicrobiana, que conduce a la reducción de protozoos y bacterias metanogénicas, lo que se traduce en una reducción constante de CH_4 en un determinado período (19,20).

Estudios anteriores han demostrado que la fermentación está influenciada por el tipo de proceso en los sustratos utilizados como recurso la Linamarina. En este sentido, Inthapaya et al (21) evaluaron los efectos utilizando hojas frescas de yuca, ensiladas, secadas al sol o al horno sobre la producción de CH₄ *in vitro*, observando que el porcentaje de CH₄ fue menor para las hojas frescas y ensiladas en comparación con las que fueron secadas al sol o al horno, con valores de 12, 11, 14 y 15% de CH₄, respectivamente. Las hojas frescas de yuca contienen una mayor cantidad de Linamarina, por lo tanto, la reducción de CH₄ es mayor en comparación con las hojas secas de yuca, que, debido al proceso de secado, disminuye la concentración de Linamarina (21). Estos resultados concuerdan con los del presente estudio, en el que dosis más altas de Linamarina producen menos concentración de CH₄. Sin embargo, Inthapaya et al (21) también observaron que a medida que transcurre el tiempo de fermentación, aumenta la producción total de gas, así como el porcentaje de CH₄ de 11 a 16% de 12 a 24 horas de fermentación. Se ha observado que, en largos tiempos de fermentación, la actividad reductora de CH₄ tiende a disminuir, probablemente debido a la habituación de los microorganismos a la inclusión del aditivo o a una reducción de la efectividad del aditivo (22,23).

En conclusión, este estudio demuestra que la adición de Linamarina al sustrato de fermentación del rumen reduce la producción de CH₄ de una manera dependiente de la dosis. Además, la acción reductora de la metanogénesis de Linamarina depende del tiempo de fermentación. Este estudio constituye una base para cualquier prueba futura que incluya fuentes vegetales de Linamarina, así como otras variables del rumen y tiempos de fermentación *in vitro* más prolongados.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca de Doctorado y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, México) por el apoyo para cursar el Doctorado fuera del país de origen.

REFERENCIAS

1. Bajželj B, Richards K, Allwood J, Smith P, Dennis J, Curmi E, Gilligan C. Importance of food-demand management for climate mitigation. *Nature Climate Change*. 2014; 4:924–929. DOI: <https://doi.org/10.1038/nclimate2353>
2. Dangal S, Tian H, Zhang B, Pan S, Lu C, Yang J. Methane emission from global livestock sector during 1890–2014: Magnitude, trends and spatiotemporal patterns. *Global Change Biol*. 2017; 23(10):4147–4161. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13709>
3. Edenhofer O, Pichs R, Sokona Y, Kadner S, Minx J, Brunner S, Agrawala S, Baiocchi G, Bashmakov IA, Blanco G, et al. Technical Summary. *Mitigation Climate Change Contribution Work*. 2014; 33–107. DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRevD.70.106002>
4. Hristov A, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, et al. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: a review of technical options for non-CO₂ emissions. FAO: ROMA; 2013. URL available in: <http://www.fao.org/3/i3288e/i3288e.pdf>
5. Mottet A, Henderson B, Opio C, Falcucci A, Tempio G, Silvestri S, Chesterman S, Gerber PJ. Climate change mitigation and productivity gains in livestock supply chains: insights from regional case studies. *Regional Environmental Change*. 2017; 17(1):129–141. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10113-016-0986-3>
6. Patra A. Effects of essential oils on Rumen fermentation, microbial ecology and Ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011; 6:416–428. DOI: <https://doi.org/10.3923/ajava.2011.416.428>
7. Kamra D, Pawar M, Singh B. Effect of Plant Secondary Metabolites on Rumen Methanogens and Methane Emissions by Ruminants. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer, Dordrecht. 2012; 6:351–370. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_12
8. Günal M, Pinski B, AbuGhazaleh A. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. *Ital J Anim Sci*. 2017; 16(3):500–506. DOI: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1291283>

9. Tekeli A, Yıldız G, Drochner W, Steingass H. Effects of essence oil additives added to different feeds on methane production Efectos sobre la producción de metano de los aceites esenciales añadiendo diferentes aditivos. *Rev MVZ Cordoba*. 2017; 22(2):5854–5866. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1023>
10. Gomaa R, González M, Arredondo J, Castelán O, Molina L. Effect of tanniferous plants on in vitro digestion and methane production. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2017; 4:371. DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a4n11.1160>
11. Phuong L, Khang D, Preston T. Methane production in an in vitro fermentation of cassava pulp with urea was reduced by supplementation with leaves from bitter, as opposed to sweet, varieties of cassava. *Livest Res Rural Dev*. 2015; 27(8):162 URL Available in: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd27/8/phuo27162.html>
12. Sornyotha S, Lay K, Ratanakhanokchai K. Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2007; 104:1750-1754. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.071>
13. Phongphanith S, Preston T, Leng R. Effect of water spinach (*Ipomoea aquatica*) and cassava leaf meal (*Manihot esculenta* Crantz) with or without biochar on methane production in an in vitro rumen incubation using ensiled or dried cassava root meal as source of carbohydrate. *Livest Res Rural Dev*. 2016; 28:72. URL Available in: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd28/5/phon28072.html>
14. Theodorou M, Williams B, Dhanoa M, McAllan A, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 1994; 48(3-4):185–197. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
15. Camacho L, Silva T, Palma M, Assunção A, Rodriguez L, Costa L, Detmann E. Evaluation of buffer solutions and urea addition for estimating the in vitro digestibility of feeds. *J Anim Sci*. 2019; 97(2):922-931. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/sky464>
16. Maherawati C, Nur M, Pranoto Y, Utami T. Effect of Cellulase Addition on Linamarin Hydrolysis in Cassava (*Manihot esculenta*) Slurry. *Pak J Nutr*. 2017; 16(12):914-920. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.914.920>
17. Inthapaya S, and Preston T. Methane production from urea-treated rice straw is reduced when the protein supplement is cassava leaf meal or fish meal compared with water spinach meal in a rumen in vitro fermentation. *Livest Res Rural Dev*. 2014; 26(9):159. URL Available in: <http://www.lrrd.org/lrrd26/9/sang26159.html>
18. Do H, Khoa T, Hao T, Preston T. Methane production in an in vitro rumen incubation is lower for leaves with low compared with high protein solubility. *Livest Res Rural Dev*. 2013; 25(7):134. URL Available in: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd25/7/hqdo25134.htm>
19. Hassan A. A review of secondary metabolites from plant materials for post harvest storage. *Int J Pure Appl Sci Technol*. 2011; 6(2):94–102. URL Available in: http://ijopaasat.in/yahoo_site_admin/assets/docs/3_IJPAST-168-V6N2.57221749.pdf
20. Vetter J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*. 2000; 38(1):11–36. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00128-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00128-2)
21. Inthapanya S, Preston T, Nguyen D, Leng R. Effect of method of processing of cassava leaves on protein solubility and methane production in an in vitro incubation using cassava root as source of energy. *Livest Res Rural Dev*. 2012; 24(2):36. URL Available in: <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd24/2/sang24036.htm>
22. Lascano C, Cárdenas E. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *R. Bras. Zootec*. 2010;(39)175-182. URL Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300020>
23. Thanh V, Preston T, Leng R. Effect on methane production of supplementing a basal substrate of molasses and cassava leaf meal with mangosteen peel (*Garcinia mangostana*) and urea or nitrate in an in vitro incubation. *Livest Res Rural Dev* 2011; 23(4):98. URL Available in: <http://www.lrrd.org/lrrd23/4/than23098.htm>