



Thèse / Thesis

requis pour
l'obtention du Titre

submitted
for the Degree of

Master of Science

UTILIZACIÓN DE ONOBRYCHIS VICIIFOLIA
PARA MODULAR EL METABOLISMO RUMINAL
Y LA BIOHIDROGENACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
DE LA DIETA

Hajer MISSAOUI

Zaragoza, octubre 2015

Institut Agronomique Méditerranéen de
Mediterranean Agronomic Institut of
Zaragoza

Université de Zaragoza
University of Zaragoza

Fondation Espagnole pour le Développement
de la Nutrition Animale
Spanish Foundation for the Development of Animal Nutrition

Utilización de *Onobrychis viciifolia* para modular el metabolismo ruminal y la biohidrogenación de ácidos grasos de la dieta

Memoria de la Tesis de Máster presentada por
Hajer Missaoui

dirigida por
Dra. Pilar de Frutos Fernández
y Dr. Gonzalo Hervás Angulo

para la obtención del título de
Master of Science del CIHEAM en Nutrición Animal,
otorgado por el IAMZ-CIHEAM.

Zaragoza, septiembre de 2015

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han puesto a nuestra disposición sus conocimientos y los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Primero me gustaría dar mis sinceros agradecimientos a mis directores de tesis, la Dra. Pilar de Frutos y el Dr. Gonzalo Hervás por su esfuerzo, dedicación, y su apoyo a lo largo de la realización de este trabajo, así como también haberme tenido toda la paciencia para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Mi agradecimiento también va dirigido al Dr. Pablo Toral y Dr. Álvaro Belenguer por todo el apoyo y la ayuda lo que me han dado durante este periodo.

Gracias, de corazón, a todo el equipo de investigación para ayudarme y darme la oportunidad de trabajar con ellos.

De la misma manera quiero agradecer al CIHEAM y al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) por todo el apoyo y la ayuda durante estos dos años del master.

Un especial agradecimiento al Dr. Armando Occon, coordinador Area of Animal Production del IAMZ.

Mil gracias a todo el personal del Instituto de Ganadería de Montaña de León (IGM) para su ayuda y su colaboración.

Igualmente deseo agradecer a mis compañeros de la sala de becarios por este tiempo que hemos pasado juntos y este ánimo: a Alex, Tama, Caro, Edgar, David y Saida.

Para terminar, deseo dedicar este trabajo a una persona muy especial en mi vida, aunque no se encuentre físicamente conmigo, pero yo sé que en todos los momentos estuvo conmigo, por eso a tu alma mi padre, donde te encuentres, algún día nos volveremos a encontrar, “solo partimos para encontrarnos de nuevo”.

A mi madre, gracias a su amor, sacrificio y apoyo lo complicado se ha notado menos.

A mi querido hermano por su sacrificio, esfuerzo y todo el amor lo que me ha dado a lo largo de mi vida.

A mis hermanas, quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer, a vosotras por ser mi fuente de motivación. A todos los niños de la casa, especialmente al pequeñito Adam.

A mis amigos y compañeros de clase por compartir el conocimiento, la alegría y la tristeza.

Mil gracias a todas las personas, que de una manera u otra han sido claves en mi vida.

	Página
AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN	XXI
SUMMARY	XXV
RÉSUMÉ	XXIX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Taninos	7
1.1. Definición, clasificación y propiedades químicas de los taninos	7
1.2. Distribución de los taninos en la naturaleza	9
2. Utilización de leguminosas ricas en taninos en la alimentación de los rumiantes y especialmente en la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos de la dieta	10
3. Suplementación de la dieta de rumiantes con aceites vegetales insaturados	12
3.1. Aceites ricos en ácido linoleico	13
3.2. Aceites ricos en ácido linolénico	15
III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y técnica de producción de gas	25
1.1. Sustratos de incubación	25
1.2. Animales donantes del inóculo ruminal	25
1.3. Procedimientos	26
1.3.1. Parámetros indicativos de la fermentación ruminal	27
1.3.2. Biohidrogenación ruminal	29
2. Análisis químicos	29
2.1. Alimentos	29
2.2. Amoníaco y ácidos grasos volátiles	30
2.3. Perfil de ácidos grasos	31
3. Análisis estadísticos	33

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
1. Composición química y perfil lipídico de los henos y de los aceites	37
2. Biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos	39
3. Fermentación ruminal	47
VI. CONCLUSIONES.....	51
VII. BIBLIOGRAFÍA	55

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo	27
Tabla 2. Composición química y perfil de ácidos grasos (media \pm error estándar de la media) de los henos de alfalfa y esparceta utilizados como sustrato en los cultivos in vitro	37
Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de los aceites de girasol y lino	39
Tabla 4. Concentraciones de diversos ácidos grasos de cadena larga del contenido ruminal (g/100 g AG totales) tras 0, 6 y 24 h de incubación con aceite de girasol.....	40
Tabla 5. Concentraciones de diversos ácidos grasos de cadena larga del contenido ruminal (g/100 g AG totales) tras 0, 6 y 24 h de incubación con aceite de lino	41
Tabla 6. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de girasol	48
Tabla 7. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de lino	48

Figura 1. Moléculas de (a) tanino hidrolizable (galoil) y (b) condensado (flavan-3-ol). Extraído de Hervás (2001).....	8
Figura 2. Posibles rutas metabólicas del 18:2n-6 en el rumen. Las flechas con línea continua resaltan las principales rutas de biohidrogenación, mientras que las flechas con línea discontinua describen la formación de metabolitos minoritarios (extraído de Shingfield et al., 2010).....	14
Figura 3. Posibles rutas metabólicas del 18:3n-3 en el rumen. Las flechas con línea continua resaltan las principales rutas de biohidrogenación, mientras que las flechas con línea discontinua describen la formación de metabolitos minoritarios (extraído de Shingfield et al., 2010).....	16
Figura 4. Sección parcial de un cromatograma obtenido a partir de una muestra de contenido ruminal. Se indican los tiempos de retención y la identificación de los ácidos grasos	32
Figura 5. Evolución (horas 0, 6 y 24) de las concentraciones (g/100 g AG totales) de diversos AG en las incubaciones de alfalfa (línea continua) y esparceta (línea discontinua) suplementadas con un 2% de aceite de girasol	42
Figura 6. Evolución (horas 0, 6 y 24) de las concentraciones (g/100 g AG totales) de diversos AG en las incubaciones de alfalfa (línea continua) y esparceta (línea discontinua) suplementadas con un 2% de aceite de lino	43

A/P	Relación acético/propiónico
AG	Ácidos grasos
AGV	Ácidos grasos volátiles
BH	Biohidrogenación
CLA	Ácido linoleico conjugado
DMOX.....	Derivados 4,4-dimetiloxazolínicos
DMS	Desaparición de MS
EE	Extracto etéreo
eed	Error estándar de la diferencia
FAD.....	Fibra ácido detergente
FAME.....	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	Detector de ionización de llama
FND	Fibra neutro detergente
GC-MS	Cromatografía de gases y espectrometría de masas
ivDV.....	Digestibilidad verdadera in vitro
LA	Ácido linoleico (<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2 o 18:2n-6)
LAD.....	Lignina ácido detergente
LNA.....	Ácido linolénico (<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:2 o 18:3n-3)
MO	Materia orgánica
MS.....	Materia seca
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
N.....	Nitrógeno
ns	No significativo
OBCFA	Ácidos grasos impares y ramificados
P	Probabilidad (nivel de significación)
PB.....	Proteína bruta
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados
PV.....	Peso vivo
PVPP.....	Polivinilpolipirrolidona
RA.....	Ácido ruménico (<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 o <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA)
SFA	Ácidos grasos saturados
TC	Taninos condensados
TH.....	Taninos hidrolizables
TT	Taninos totales
VA.....	Ácido vaccénico (<i>trans</i> -11 18:1)

Existe aún bastante controversia acerca de la capacidad de los taninos para modular el proceso de biohidrogenación ruminal (BH) de los ácidos grasos (AG) y mejorar el perfil lipídico de la leche o la carne sin afectar negativamente a la utilización digestiva de la dieta. A partir de esta base, este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de investigar el efecto de la presencia de taninos en la dieta (en concreto, en el heno de esparceta, *Onobrychis viciifolia*) sobre la BH de los ácidos linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) y el proceso de fermentación ruminal.

El estudio se realizó in vitro, mediante cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y la técnica de producción de gas. Como donantes del inóculo microbiano se utilizaron ovejas canuladas en el rumen. Los sustratos incubados fueron dos henos de leguminosas: uno de alfalfa (prácticamente libre de taninos) y otro de esparceta (similar al anterior en cuanto a su composición química pero con un 3,5% de taninos totales en equivalentes de ácido tánico). Ambos henos se enriquecieron con aceite de girasol (como fuente de ácido linoleico) o aceite de lino (como fuente de ácido linolénico). La parte analítica incluyó determinaciones de taninos, del perfil lipídico del contenido ruminal (centrado fundamentalmente en metabolitos de interés como 18:0, *trans*-11, *trans*-10 y *cis*-9 18:1, *cis*-9 *trans*-11 18:2 -principal isómero del ácido linoleico conjugado; CLA-, *trans*-11 *cis*-15 18:2, 18:2n-6 y 18:3n-3) y de algunos parámetros indicativos de la fermentación en el rumen (e. g., producción de gas, concentración de amoníaco, desaparición de materia seca, etc.).

La mayor parte de los resultados relativos a los metabolitos intermedios de la BH (e. g., mayores concentraciones de 18:3n-3, 18:2n-6, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 18:1 o AG poliinsaturados totales en las incubaciones de esparceta) muestran la capacidad de esta leguminosa, posiblemente atribuible a su contenido de taninos, para inhibir la BH ruminal de los AG insaturados de la dieta. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,10$) en la acumulación de *cis*-9 *trans*-11 CLA, CLA total o 18:0, y la variación en el *trans*-11 18:1 no siguió un patrón regular.

En cuanto a la fermentación ruminal, se observó que la producción de gas era inferior en las incubaciones del heno de esparceta (-17%), lo cual coincide con lo señalado previamente por muchos autores cuando se utilizan taninos. De acuerdo con esto, las concentraciones de amoníaco también mostraron un valor más bajo en la

esparceta (-23%), al igual que la producción de ácidos grasos volátiles totales (-11%), siendo las proporciones molares de butírico y valérico las que mejor reflejaron esta diferencia.

En conjunto, el estudio muestra la capacidad de *Onobrychis viciifolia*, seguramente gracias a su contenido moderado de taninos, para modificar la BH ruminal de los AG insaturados de la dieta, lo cual podría redundar en una mejora del perfil lipídico de los productos finales (carne y leche). Sin embargo, los resultados observados no son tan prometedores como cabría esperar a priori o como se han conseguido con otras estrategias nutricionales.

There is still controversy surrounding the ability of tannins to modulate the process of biohydrogenation (BH) of fatty acids (FA) in the rumen and improve the lipid profile of milk or meat without conferring a negative response in the digestive utilization of the diet. Based on this, the current work was performed with the aim of investigating the effect of dietary tannins (particularly those from sainfoin -*Onobrychis viciifolia*- hay) on the BH of linoleic (18:2n-6) and linolenic (18:3n-3) acids and on the ruminal fermentation.

This study was carried out in vitro, using batch cultures of rumen microorganisms and the gas production technique. Rumen cannulated sheep were used as donors of microbial inocula. Two legume hays, alfalfa (virtually free of tannins) and sainfoin (with a similar chemical composition but containing 3.5% total tannins, expressed as tannic acid equivalents), were utilized as incubation substrates. Both hays were enriched with either sunflower oil (as a source of linoleic acid) or linseed oil (as a source of linolenic acid). The analytical techniques included the determination of tannins, of the lipid profile of rumen contents (focused primarily on relevant metabolites such as 18:0, *trans*-11, *trans*-10 and *cis*-9 18:1, *cis*-9 *trans*-11 18:2 -the main isomer of the conjugated linoleic acid; CLA-, *trans*-11 *cis*-15 18:2, 18:2n-6 and 18:3n-3) and of some rumen fermentation parameters (e.g., gas production, ammonia concentration, dry matter disappearance, etc.).

Most results related to intermediate BH metabolites (e.g., greater concentrations of 18:3n-3, 18:2n-6, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 18:1 or total polyunsaturated FA in sainfoin incubations) show the ability of this legume, possibly due to its tannin content, to inhibit the ruminal BH of dietary unsaturated FA. On the other hand, no significant differences ($P>0.10$) were detected in the accumulation of *cis*-9 *trans*-11 CLA, total CLA or 18:0, and variations in *trans*-11 18:1 did not follow a regular pattern.

Regarding the rumen fermentation, it was observed that gas production was lower in the incubations with sainfoin hay (-17%), which is consistent with previous findings when using tannins. Accordingly, ammonia concentrations and total volatile fatty acid (VFA) production also presented smaller values with sainfoin (-23% and -11%, respectively); differences in VFA being especially clear in the molar proportions of butyrate and valerate.

Overall, the study shows the ability of *Onobrychis viciifolia*, probably by means of its moderate tannin content, to modify the ruminal BH of dietary unsaturated FA, which could result in improvements in the lipid profile of final products (meat and milk). Nonetheless, the present results are not as promising as expected or as obtained before with other nutritional strategies.

Il existe encore une controverse sur la capacité des tannins pour moduler le processus de biohydrogenation ruminale (BH) des acides gras (AG) et améliorer le profil lipidique du lait ou de la viande sans altérer l'utilisation digestive du régime. Dans ce contexte, cette étude a été menée dans l'objectif d'examiner l'effet de la présence de tannins dans le régime (plus précisément, dans le foin de sainfoin, *Onobrychis viciifolia*) sur la BH des acides linoléique (18:2n-6) et linolénique (18:3n-3) et la fermentation ruminale.

L'étude a été conduite in vitro, moyennant des cultures discontinues de microorganismes ruminiaux et la technique de production de gaz. Des brebis équipées d'une canule ruminale ont été utilisées en tant que donatrices d'inoculum ruminal. Les substrats incubés étaient deux types de foins de légumineuses : un de luzerne (presque libre de tannins) et un autre de sainfoin (avec une composition chimique similaire à celui précédent mais avec 3,5% de tannins totaux, exprimés en équivalents d'acide tannique). Tous les deux ont été enrichis en huile de tournesol (comme source d'acide linoléique) ou de lin (comme source d'acide linolénique). La partie analytique inclut des déterminations des tannins, du profil lipidique du contenu ruminal (ciblé sur des métabolites d'intérêt comme 18:0, *trans*-11, *trans*-10 et *cis*-9 18:1, *cis*-9 *trans*-11 18:2 -l'isomère principal de l'acide linoléique conjugué; CLA-, *trans*-11 *cis*-15 18:2, 18:2n-6 et 18:3n-3) et de quelques paramètres indicatifs de la fermentation ruminale (par exemple, production de gaz, concentration d'ammoniac, disparition de la matière sèche, etc.).

La majorité des résultats relatifs aux métabolites intermédiaires de la BH (par exemple, augmentations des concentrations de 18:3n-3, 18:2n-6, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 18:1 ou AG polyinsaturés totaux dans les incubations avec du sainfoin) montrent la capacité de cette légumineuse, probablement imputable à la présence de tannins, à inhiber la BH ruminale des AG insaturés du régime. En outre, l'accumulation de *cis*-9 *trans*-11 CLA, CLA totale ou 18:0 n'a pas été modifiée significativement ($P>0,10$) et la variation de celle du *trans*-11 18:1 ne suivit pas un schéma régulier.

En ce qui concerne la fermentation ruminale, les résultats ont montré que la production de gaz était inférieure dans les incubations avec du sainfoin (-17%), en accord avec ce qui a été rapporté par des nombreux auteurs lors de l'utilisation des

tannins. De même, les concentrations d'ammoniac ont montré une valeur plus basse avec le sainfoin (-23%), ainsi que la production d'acides gras volatiles totaux (-11%), dont les proportions molaires de butyrique et valérique étaient celles qui ont le mieux reflété cette différence.

Globalement, les résultats de cette étude montrent la capacité d'*Onobrychis viciifolia*, certainement en raison de son contenu modéré de tannins, à modifier la BH ruminale des AG insaturés du régime, ce qui à son tour pourrait améliorer le profil lipidique des produits finals (viande et lait). Toutefois, les résultats obtenus ne sont pas si encourageants comme on pourrait a priori s'y attendre ou comme le démontrent d'autres stratégies nutritionnelles.

La elevada incidencia de enfermedades de tipo cardiovascular, metabólico y degenerativo fomentadas por una dieta inadecuada (OMS, 2003) está siendo un detonante para que la población se mentalice de la necesidad de mejorar los hábitos alimentarios y conseguir que la dieta pase de ser un factor de riesgo a un pilar de prevención (Toral et al., 2009). Esto ha supuesto un estímulo para la modificación del perfil lipídico de las grasas de los alimentos derivados de los rumiantes (i. e., carne y leche), de modo que se fomente su carácter potencialmente saludables para el consumidor (Shingfield et al., 2008b).

Entre los ácidos grasos (AG) considerados más deseables cabría destacar los n-3 de cadena muy larga (tipo DHA, DPA o EPA) y, especialmente, el ácido linoleico conjugado (CLA). Diversos trabajos basados en estudios epidemiológicos y modelos celulares señalan que este conjunto de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (18:2n-6) posee propiedades antiaterogénicas, antiinflamatorias o inmunomoduladoras, entre otras (Lock y Bauman, 2004; Shingfield et al., 2008b).

El *cis*-9 *trans*-11 18:2 (ácido ruménico, RA) es el isómero más abundante del CLA y se supone que es el principal responsable de los efectos potencialmente beneficiosos para la salud de los humanos que se le atribuyen al CLA. El RA que aparece en la leche o en la carne de los animales rumiantes deriva fundamentalmente de su síntesis endógena, gracias a la enzima Δ 9-desaturasa o esteroil-CoA desaturasa, a partir del *trans*-11 18:1 (ácido vaccénico, VA), aunque una parte también puede formarse en el rumen, mediante el proceso de biohidrogenación ruminal (BH) del ácido linoleico (LA; *cis*-9 *cis*-12 18:2 o 18:2n-6).

Gracias a la BH, a partir del 18:2n-6 y también del ácido linolénico (LNA; *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3 o 18:3n-3), principales AG consumidos con la dieta, se produce *trans*-11 18:1 en el rumen. Después, una parte elevada y muy variable de este isómero 18:1 será reducida a 18:0 (ácido esteárico) como paso final de la BH (Jenkins et al., 2008). Cuantos más AG insaturados se acumulen en el rumen y pasen al intestino, mayor será su aparición en los productos finales de los rumiantes.

Por lo tanto, existe un incuestionable interés en conseguir modificar el proceso de BH ruminal para inhibir el último paso y permitir así una acumulación de VA en el

rumen que podría dar lugar, posteriormente, a una mayor concentración de CLA en la leche o en la carne.

Algunos estudios previos, especialmente in vitro (e. g., Vasta et al., 2009; Buccioni et al., 2011), han señalado que los taninos son capaces de inhibir el último paso de la BH, consiguiendo así una mayor acumulación de VA.

Sin embargo, los trabajos llevados a cabo por el equipo con el que se realizó esta tesis de máster, tanto in vivo (Toral et al., 2011 y 2013) como in vitro (Benhissi et al., 2013b; Carreño et al., 2015) apuntan más bien a una inhibición general del proceso del BH y no a una inhibición específica del último paso.

A pesar de ello, dadas las enormes variaciones existentes entre diferentes tipos de taninos (Carreño et al., 2015), es preciso continuar la investigación para poder llegar a seleccionar un tipo y dosis de tanino que permita, como objetivo final, mejorar la calidad nutricional de la leche o la carne sin afectar negativamente a la utilización digestiva de la dieta y, consecuentemente, al rendimiento productivo de los animales. Este objetivo representa la base sobre la que se asienta este trabajo, cuyos objetivos específicos se describen en un capítulo posterior.

Por otro lado, es importante indicar que muchos estudios acerca del uso de taninos se han realizado con extractos comerciales (e. g., Buccioni et al., 2011; Toral et al., 2011 y 2013; Carreño et al., 2015) pero resultaría de especial interés práctico encontrar un forraje con un buen contenido de estos compuestos fenólicos que permitiera su uso directo por los animales.

En este sentido, diversos trabajos sobre la esparceta (*Onobrichys viciifolia*) describen resultados muy prometedores atribuibles a su contenido de taninos condensados (Khiaosa-Ard et al., 2009; Girard et al., 2015) y sugieren la posibilidad de su utilización, en condiciones prácticas de explotación, para modular la BH ruminal de los AG poliinsaturados de la dieta.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. TANINOS

Aunque los taninos fueron ignorados durante mucho tiempo en los estudios de nutrición animal, en las últimas décadas se ha prestado mayor atención a su incidencia en este campo, especialmente en aquellos sistemas de producción basados en el aprovechamiento de pastos o de forrajes que contienen estos compuestos secundarios (Frutos et al., 2004b).

1.1. Definición, clasificación y propiedades químicas de los taninos

Dada la complejidad de estos compuestos, en la literatura existen numerosas definiciones del término tanino. Quizás la más aceptable sea la que considera que los taninos son un grupo muy complejo de compuestos fenólicos, con un alto peso molecular, que poseen la capacidad de formar complejos reversibles o irreversibles con las proteínas principalmente, y también con otras moléculas como los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.), alcaloides, ácidos nucleicos, minerales, etc. (McLeod, 1974; Hervás, 2001).

Basándose en su estructura molecular, aunque quizás de modo simplista, los taninos se suelen clasificar en dos grupos (McMahon et al., 2000): taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC), como se muestra en la Figura 1.

Los taninos hidrolizables son polialcoholes constituidos por un glúcido cuyos grupos hidroxilo se encuentran esterificados con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico (galotaninos y elagitaninos, respectivamente). Son compuestos fácilmente hidrolizables tanto por ácidos y bases como por vía enzimática. Los taninos condensados son oligómeros o polímeros de hidroxiflavonoles. También se les denomina proantocianidinas debido a que, sometiénolos a calor en soluciones ácidas, dan lugar a antocianidinas. Carecen de núcleo glucídico y no son susceptibles de ser hidrolizados debido a los enlaces C-C que presentan (para más detalles, ver las revisiones de Doce, 2010 y Mueller-Harvey, 2006).

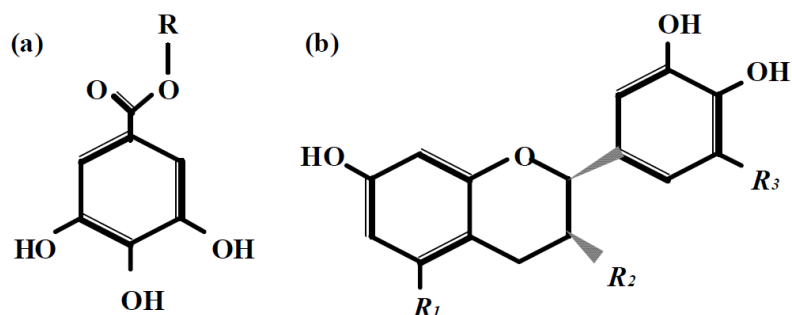


Figura 1. Moléculas de (a) tanino hidrolizable (galoil) y (b) condensado (flavan-3-ol). Extraído de Hervás (2001).

Como ya se ha mencionado, la propiedad más singular de los taninos es su elevada afinidad por las proteínas, aunque también puede unirse a otros polímeros, con los que tiende a formar complejos estables. Los múltiples grupos fenólicos y anillos arilos confieren a los taninos su efectividad para formar estos complejos, que puede producirse mediante distintos tipos de uniones químicas, siendo la más importante la unión por puentes de hidrógeno reversibles (McLeod, 1974; Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Mueller-Harvey, 2006).

Las interacciones producidas entre los taninos y las proteínas son específicas y dependen en gran parte de las características de ambos compuestos. Por parte de los taninos, intervienen su grado de polimerización, su estructura y flexibilidad conformacional o su solubilidad y por parte de las proteínas, la conformación estructural, el peso molecular o la composición en aminoácidos (Asquith y Butler, 1986). Además, son también determinantes las condiciones de la solución donde se lleve a cabo la formación de los complejos con los taninos. Así, por ejemplo, se ha constatado que el mayor grado de estabilidad de las uniones tanino-proteína ocurre en rangos de pH comprendidos entre aproximadamente 3,5 y 8, en los que se sitúa el pH ruminal, frente a los valores observados en el abomaso (2,5-3) y duodeno (aprox. 8; McLeod, 1974; Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Frutos et al., 2004b).

Aunque la capacidad para formar complejos con las proteínas sea la característica más importante y conocida de los taninos, también cabe señalar su poder quelante y secuestrador de radicales libres, su capacidad reductora y su actividad antioxidante (ver la revisión de Doce, 2010).

1.2. Distribución de los taninos en la naturaleza

Los taninos son posiblemente uno de los metabolitos secundarios más comunes de las plantas y tienen una amplia distribución en el reino vegetal, encontrándose fundamentalmente en hojas de árboles, en arbustos y en leguminosas herbáceas (McLeod, 1974; McMahon et al., 2000; Frutos et al., 2004b; Rodríguez et al., 2011). Por ello, a pesar de la idea generalizada de que los taninos solo aparecen en especies vegetales de zonas áridas o tropicales, también es posible encontrar numerosas especies con un contenido apreciable de taninos) en ambientes con influencia atlántica o mediterránea (Silanikove, 2000; Frutos et al., 2002).

El contenido de taninos puede variar considerablemente entre los distintos órganos y tejidos vegetales, así como a lo largo del desarrollo fenológico de la planta y dependiendo de diferentes factores ambientales y estacionales (McMahon et al., 2000; Álvarez del Pino et al., 2005). Ello se explica, en parte, por la estrategia de defensa de las plantas, pues los taninos tienden a ser más abundantes en aquellas partes de más valía (hojas nuevas y flores), que son las más susceptibles de ser consumidas por los herbívoros (Van Soest, 1994; Álvarez del Pino et al., 2005). De igual manera, las altas temperaturas, el estrés hídrico o la baja calidad de los suelos pueden aumentar el contenido de taninos de las especies vegetales (Van Soest, 1994; McMahon et al., 2000).

Respecto a la presencia de taninos en especies comunes en la alimentación de los rumiantes, podrían destacarse algunas leguminosas como por ejemplo *Onobrychis viciifolia* (esparceta), *Hedysarium coronarium* (zulla) o *Lotus corniculatus* (McMahon et al., 2000; Tava et al., 2005; Copani et al., 2014). Gracias a sus contenidos moderados de taninos condensados, la inclusión de estas especies forrajeras en la dieta de los rumiantes podría ser especialmente útil para conseguir algunos de los efectos favorables de los taninos (e. g., disminución de la degradación de la proteína en el rumen, prevención del timpanismo o control de parasitosis digestivas), sin ejercer efectos tóxicos sobre los animales (Mueller-Harvey, 2006; Hayot Carbonero et al., 2011). En el caso concreto de la esparceta, podría destacarse también su rusticidad y su tolerancia a los climas fríos y suelos pobres, así como a la sequía, además de que su cultivo es beneficioso para la regeneración de tierras de labor esquiladas por otros

cultivos y para el mantenimiento de la diversidad de los agroecosistemas. Sin embargo, su cultivo ha caído en las últimas décadas por su baja productividad y la dificultad de su mantenimiento (Delgado et al., 2004; Hayot Carbonero et al., 2011).

Recientemente, algunos trabajos han sugerido que la utilización de leguminosas ricas en taninos también podría ser interesante para modificar el metabolismo de los lípidos en el rumen (Turner et al., 2005; Cabiddu et al., 2009; Girard et al., 2015). Este punto será descrito a continuación con mayor detalle, debido a su repercusión en la calidad de los productos provenientes de los rumiantes y a su relevancia en esta tesis.

2. UTILIZACIÓN DE LEGUMINOSAS RICAS EN TANINOS EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS RUMIANTES Y ESPECIALMENTE EN LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA

Aunque aún son escasos los trabajos publicados al respecto, algunos estudios han señalado que la alimentación de los rumiantes con leguminosas ricas en taninos podría modular la biohidrogenación (BH) ruminal, constituyendo una estrategia natural para mejorar el perfil de AG de la leche y la carne en respuesta a la demanda de los consumidores (Abbedou et al., 2011; Vasta y Luciano, 2011; Girard et al., 2015). De estos estudios, una parte importante se ha llevado a cabo en pequeños rumiantes alimentados con zulla (Roy et al., 2002; Addis et al., 2005; Bonanno et al., 2013). Sin embargo, existe muy poca información disponible respecto a la utilización de otros forrajes como la esparceta, cuyo cultivo había caído prácticamente en desuso pero se está intentando recuperar y potenciar en la Península Ibérica (Delgado et al., 2004).

La zulla (*Hedysarium coronarium*) es una leguminosa semiperenne bianual típica de ambientes mediterráneos. Contiene una cantidad moderada de taninos condensados, principalmente monómeros de delfinidina y cianidina (Tava et al., 2005), y puede mejorar el rendimiento productivo de corderos y ovejas lecheras (Terrill et al., 1992; Molle et al., 2003; Bonanno et al., 2007). Sus efectos sobre el perfil de AG de los productos de rumiantes son bastante consistentes, habiéndose observado en casi todos los casos un aumento de la concentración de los principales AG poliinsaturados procedentes de la dieta, 18:2n-6 y 18:3n-3, tanto en la carne (Priolo et al., 2005) como en la leche (Roy et al., 2002; Cabiddu et al., 2009; Bonanno et al., 2013). En algunos casos (Addis et al., 2005; Cabiddu et al., 2009), estos cambios se vieron acompañados

también por descensos en el contenido de ácidos ruménico (RA; *cis*-9 *trans*-11 CLA) y vaccénico (VA; *trans*-11 18:1), que derivan del metabolismo ruminal de los anteriores, lo cual sugiere que la zulla reduce la extensión de la BH de los AG insaturados en el rumen. La información disponible respecto al efecto de esta leguminosa forrajera sobre otros metabolitos intermedios menos abundantes es, sin embargo, sumamente escasa, por lo que no se sabe con seguridad si esta inhibición de la BH podría estar acompañada de alteraciones en sus rutas metabólicas.

El loto corniculado (*Lotus corniculatus*) tiene un alto valor nutritivo y, gracias a sus taninos condensados (básicamente monómeros de prodelfinidina), numerosos trabajos han mostrado que su consumo permite aumentar el flujo de proteína no degradable al intestino (Waghorn et al., 1987). La inclusión de esta leguminosa en la dieta de ovejas y vacas lecheras también se ha asociado con aumentos en la producción de leche (Wang et al., 1996; Turner et al., 2005), pero se sabe poco acerca de sus posibles efectos sobre la BH ruminal. No obstante, la información disponible indica que su mecanismo de acción podría ser similar al de la zulla, pues los cambios en el perfil de AG de la leche (aumentos en la concentración de 18:2n-6 y 18:3n-3 y descensos en la de 18:0, VA y RA) sugieren una inhibición de la extensión de la BH ruminal (Turner et al., 2005; Girard et al., 2015).

Los efectos beneficiosos de la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) sobre el metabolismo proteico en los rumiantes también parecen explicarse por su contenido de taninos condensados (fundamentalmente procianidina y prodelfinidina; Hayot Carbonero et al., 2011). Sin embargo, se conoce aún muy poco sobre sus posibles efectos sobre el metabolismo ruminal de los AG. A este respecto, en un estudio con corderos en crecimiento se observó, de forma similar al caso de la zulla y del loto corniculado, un aumento significativo en la concentración de ácidos linoleico y linolénico y un descenso en el de AG saturados en el músculo (Girard et al., 2015). No obstante, no parece existir información disponible acerca de su acción sobre los principales isómeros *trans* 18:1 y otros metabolitos intermedios de la BH ruminal con características potencialmente bioactivas.

Además, también persiste un gran desconocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales los taninos ejercerían sus efectos sobre el metabolismo de los AG

en el rumen, si bien todo apunta a que estos podrían estar mediados por cambios en la comunidad bacteriana (Vasta et al., 2010; Carreño et al., 2015).

3. SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA DE RUMIANTES CON ACEITES VEGETALES INSATURADOS

Durante décadas, se han añadido lípidos vegetales a la dieta de los rumiantes para cubrir sus necesidades energéticas en las explotaciones situadas en áreas desfavorecidas (donde pueden escasear los alimentos en determinados periodos del año) o con altos niveles de producción (Gargouri et al., 2006; Pulina et al., 2006). En la mayor parte de los casos, se han utilizado aceites protegidos (como las sales cálcicas de aceite de palma) para mantener producciones altas de leche o grasa (Gargouri et al., 2006), pero hoy en día se pone un mayor énfasis en la inclusión de lípidos vegetales insaturados para modular la BH ruminal y, con ello, el perfil de AG de la leche o la carne. En este sentido, por ejemplo, cuando el objetivo es mejorar el contenido de RA de la grasa láctea, la suplementación de la dieta con lípidos ricos en 18:2n-6 y 18:3n-3 es muy efectiva en vacas, ovejas y cabras (Shingfield et al., 2010).

Los lípidos de origen vegetal se pueden suministrar en forma de semillas de oleaginosas, aceites protegidos o aceites libres, siendo estos últimos los que ejercen mayores efectos sobre el perfil de AG de la leche (Glasser et al., 2008). Cabe destacar que, si bien existe la idea generalizada de que los lípidos insaturados pueden afectar negativamente a la fermentación ruminal, la respuesta depende del tipo de aceite usado y especialmente de su nivel de inclusión en la dieta (Jenkins, 1993; Atkinson et al., 2006; Shingfield et al., 2008a). Las dosis de aceites que se añaden para modificar el perfil lipídico de los productos finales suelen ser bajas o moderadas ($\leq 4\%$ de la materia seca) y no tienen por qué asociarse con efectos negativos sobre los procesos de digestión en el rumen (Atkinson et al., 2006; Toral et al., 2010b; Shingfield et al., 2008a).

3.1. Aceites ricos en ácido linoleico

En los últimos años se ha avanzado de forma considerable en el estudio de las rutas de BH del ácido linoleico (*cis*-9 *cis*-12 18:2), ya que anteriormente se pensaba que implicaba únicamente tres pasos: una isomerización inicial a *cis*-9 *trans*-11 CLA, seguida de una hidrogenación a *trans*-11 18:1 y, a continuación, otra reducción a 18:0 (Jenkins et al., 2008). Sin embargo, con el tiempo se han identificado numerosos metabolitos intermedios 18:2 y 18:1 (ver Figura 2; Jenkins et al., 2008; Shingfield et al., 2010). También se ha demostrado que a pesar de la concentración relativamente baja de algunos isómeros minoritarios (por ejemplo, el *trans*-10 *cis*-12 y el *trans*-9 *cis*-11 CLA), su efecto biológico en el animal podría ser de gran relevancia (Harvatine et al., 2009).

En las ovejas lecheras se ha llevado a cabo un buen número de estudios con el objetivo de evaluar la inclusión de aceites vegetales ricos en 18:2n-6 en la dieta sobre la composición de la grasa de la leche (e. g., Mele et al., 2006; Hervás et al., 2008). En ellos se observó, por ejemplo, que la suplementación de una dieta rica en alimentos concentrados con un aceite de girasol resulta más efectiva para aumentar el contenido de VA y CLA en la grasa láctea que la misma dosis de aceite de soja (Gómez-Cortés et al., 2008). Este tipo de estrategia es asimismo muy útil a la hora de disminuir la cantidad de AG saturados de cadena media (12:0, 14:0 y 16:0; Mele et al., 2006; Toral et al., 2010a), cuyo consumo en exceso podría suponer un riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Lock et al., 2008). Sin embargo, el uso de suplementos ricos en 18:2n-6 no suele aumentar la concentración de este AG poliinsaturado en la leche, probablemente por un aumento en la extensión de su BH ruminal en respuesta a su mayor aporte con la dieta (Glasser et al., 2008; Shingfield et al., 2008a).

Además, al contrario de lo que sucede con frecuencia en el ganado vacuno en condiciones similares, el rendimiento productivo de las ovejas no se ve perjudicado por el aporte de este tipo de aceites y el porcentaje graso de su leche no solo no disminuye, sino que incluso puede aumentar (Pulina et al., 2006; Hervás et al., 2008).

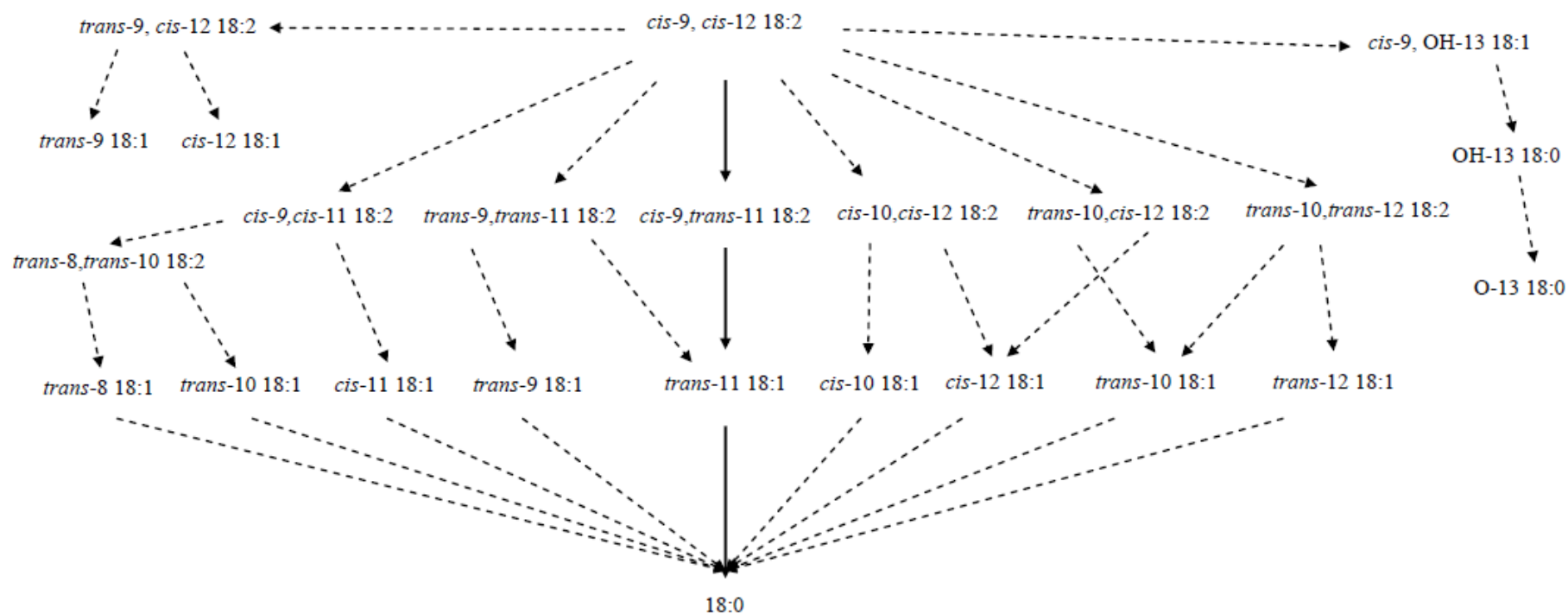


Figura 2. Posibles rutas metabólicas del 18:2n-6 en el rumen. Las flechas con línea continua resaltan las principales rutas de biohidrogenación, mientras que las flechas con línea discontinua describen la formación de metabolitos minoritarios (extraído de Shingfield et al., 2010).

A pesar de todos estos efectos positivos de la suplementación con aceites ricos en 18:2n-6, es de rigor puntualizar que, en algunos casos, también se observan concentraciones de *trans*-10 18:1 relativamente altas (Gómez-Cortés et al., 2008; Shingfield et al., 2010), cuyas implicaciones para la salud humana aún no están claras (Shingfield et al., 2008b). En el vacuno, los aumentos progresivos del contenido lácteo de este isómero 18:1 se acompañan con frecuencia de reducciones del *trans*-11 18:1 y, consecuentemente, del *cis*-9 *trans*-11 18:2 (Chilliard et al., 2007). Sin embargo, ante condiciones similares, los pequeños rumiantes se muestran menos propensos al desarrollo de estas alteraciones y niveles altos de *trans*-10 18:1 suelen ir acompañados de aumentos muy notables del VA y RA (Hervás et al., 2008; Toral et al., 2010a).

3.2. Aceites ricos en ácido linolénico

El ácido linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3) es el principal sustrato para la BH ruminal en los rumiantes que reciben forrajes frescos, al ser su AG más abundante (Chilliard et al., 2007). El metabolismo ruminal del 18:3n-3 guarda ciertas similitudes con el del 18:2n-6. Así, de acuerdo con la mayor parte de estudios, la BH del ácido linolénico comienza con la isomerización del doble enlace en posición *cis*-12, para dar lugar a *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3, y continúa con la hidrogenación sucesiva de los dobles enlaces en posición *cis*-9 y *cis*-15, que llevan a la formación de *trans*-11 *cis*-15 18:2 y *trans*-11 18:1, respectivamente (Jenkins et al., 2008). Este último es el principal metabolito de la BH del 18:3n-3 que se acumula en el rumen y se transfiere a los productos derivados (Glasser et al., 2008; Shingfield et al., 2010). La última etapa de la BH finaliza con la formación de 18:0.

Como en el caso del 18:2n-6, durante años, las limitaciones en las técnicas de cromatografía dificultaron la descripción de otros metabolitos intermedios del 18:3n-3, lo que llevó a la simplificación en exceso de su proceso de BH (Jenkins et al., 2008). Sin embargo, actualmente se sabe que estas rutas metabólicas son mucho más complejas y que este proceso da lugar a la formación de numerosos metabolitos intermedios 18:3, 18:2 y 18:1, incluyendo el *trans*-10 18:1 (ver Figura 3; Wasowska et al., 2006; Shingfield et al., 2010).

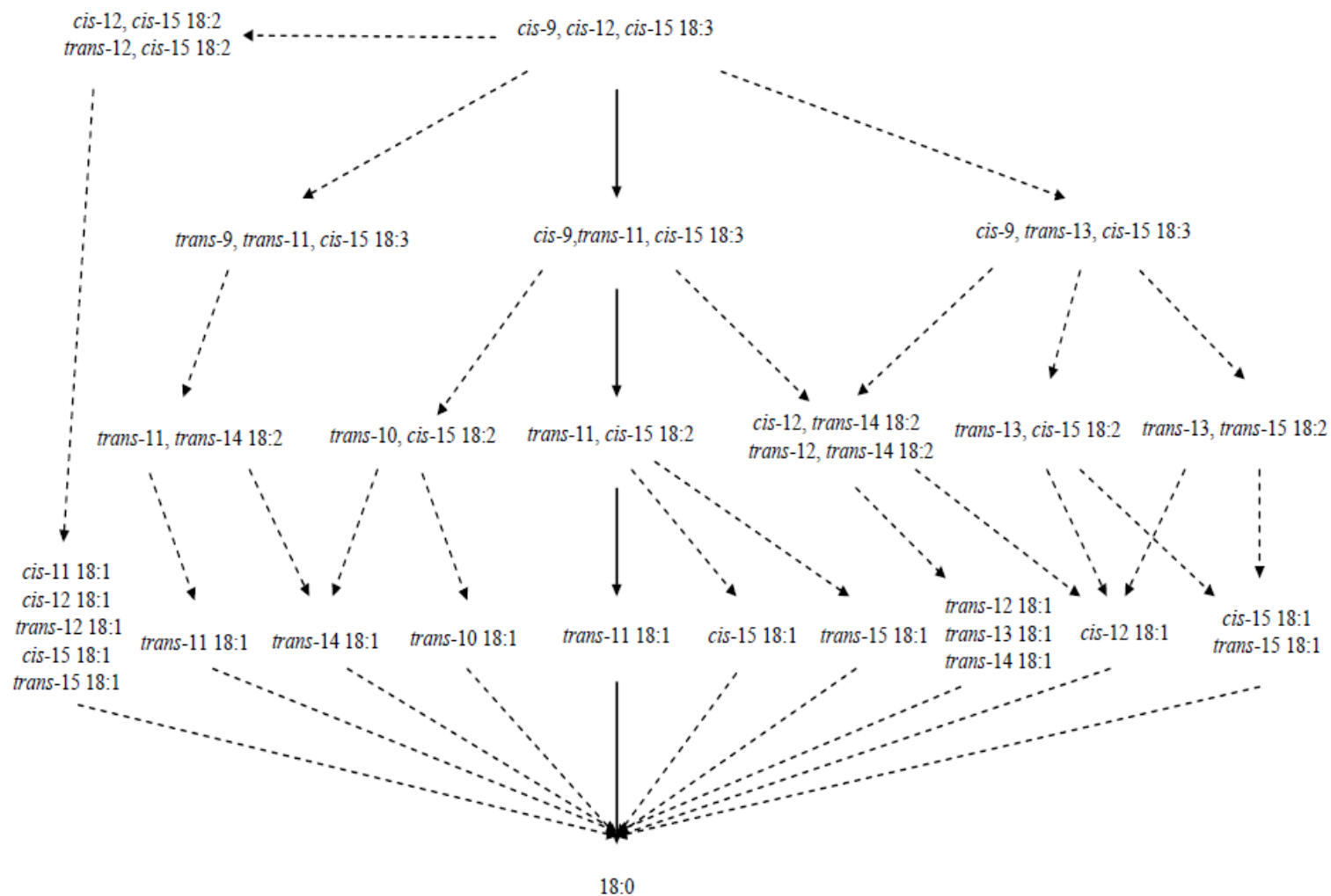


Figura 3. Posibles rutas metabólicas del 18:3n-3 en el rumen. Las flechas con línea continua resaltan las principales rutas de biohidrogenación, mientras que las flechas con línea discontinua describen la formación de metabolitos minoritarios (extraído de Shingfield et al., 2010).

En la mayor parte de los casos, la BH ruminal del 18:3n-3 varía entre un 85 y 100% del total ingerido, lo que explica su baja tasa de transferencia a la leche (Doreau y Ferlay, 1994; Shingfield et al., 2008a). Sin embargo, la suplementación de la dieta con aceites ricos en ácido linolénico, como el de lino, resulta muy útil para modificar la concentración láctea de los isómeros 18:1 y 18:2. En este sentido, aunque algunos estudios han indicado que los aceites ricos en 18:2n-6 aumentan el RA en la leche en mayor medida que los aceites ricos en 18:3n-3, esto es algo en lo que no todos los resultados coinciden (ver el metanálisis de Glasser et al., 2008). Por otra parte, tampoco es extraño que ambos puedan dar lugar a aumentos similares en el contenido de RA en los productos finales, ya que este AG deriva fundamentalmente de su síntesis endógena en los tejidos a partir de VA, gracias a la acción de la enzima Δ^9 -desaturasa, y no de la captación del RA de origen ruminal (Palmquist et al., 2005; Bichi et al., 2012).

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Este trabajo de tesis de máster se llevó a cabo con el objetivo de investigar el efecto de la presencia de taninos en la dieta, concretamente en el heno de esparceta (*Onobrychis viciifolia*), sobre:

- 1) la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos 18:2n-6 y 18:3n-3, con especial atención a la acumulación de determinados metabolitos intermedios.
- 2) la fermentación ruminal.

El estudio se realizó in vitro, mediante cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y la técnica de producción de gas. Como donantes del inóculo microbiano para las incubaciones se utilizaron ovejas canuladas en el rumen.

Los sustratos incubados fueron dos henos de leguminosas: uno de alfalfa (i. e., libre de taninos) y otro de esparceta (que es muy similar al anterior en cuanto a su composición química pero contiene taninos condensados). De cada uno de estos henos se dispuso de dos muestras independientes.

Por otra parte, los henos se enriquecieron con aceite de girasol (como fuente de ácido linoleico) o aceite de lino (como fuente de ácido linolénico) para favorecer el cumplimiento de la primera parte de los objetivos. Ahora bien, dada la diferente composición lipídica de los aceites de girasol y de lino, los datos se analizaron por separado para cada uno de ellos, ya que los resultados no serían comparables. Por lo tanto, el diseño no consistió en un factorial 2×2 .

Una vez finalizadas las incubaciones in vitro, la parte analítica incluyó determinaciones de taninos, del perfil lipídico del contenido ruminal (centrado fundamentalmente en metabolitos de interés como 18:0, *trans*-11, *trans*-10 y *cis*-9 18:1, *cis*-9 *trans*-11 CLA, *trans*-11 *cis*-15 18:2, 18:2n-6 y 18:3n-3) y de algunos parámetros indicativos de la fermentación en el rumen (e. g., producción de gas, concentración de amoníaco, desaparición de materia orgánica, etc.).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS DISCONTINUOS DE MICROORGANISMOS RUMINALES Y TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en la Nave de Experimentación de Rumiantes del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) y fueron realizados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

1.1. Sustratos de incubación

En los cultivos in vitro se utilizaron dos muestras de heno de alfalfa (el mismo que se administraba a los animales) y otras dos de esparceta. Ambos henos procedían, respectivamente, del IGM de León y del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado (P-Selecta, España) a 45 °C durante 48 horas y, posteriormente, se molieron a 1 mm de tamaño en un molino centrífugo (Retsch ZM 1000, Alemania).

1.2. Animales donantes del inóculo ruminal

Como donantes del inóculo ruminal para las incubaciones in vitro se utilizaron 3 ovejas adultas, no gestantes ni en lactación, provistas de una cánula ruminal y con un peso vivo medio de $59,4 \pm 4,77$ kg, que pertenecían al rebaño experimental del IGM.

Los animales se alojaron en jaulas individuales y recibieron, durante 18 días y en una sola toma diaria (aprox. a las 9.00 h), una cantidad restringida de heno de alfalfa (48 g MS/kg PV^{0,75}) que correspondía a aprox. 1 mantenimiento (INRA, 2007). El heno que no fue consumido voluntariamente, que fue siempre una proporción pequeña, se introdujo a través de la cánula alrededor de las 19.00 h. Todos los animales dispusieron en todo momento de agua fresca y de un bloque corrector vitamínico-mineral (Tegablock; Inatega, España).

Los días de recogida del inóculo ruminal, los animales se mantuvieron en ayuno desde la tarde anterior. Aproximadamente 1 h antes de dicha recogida (i. e., desde las 8.30 h) se evitó también el consumo de agua.

1.3. Procedimientos

Tras 15 y 17 días de consumo de la dieta (i. e., del heno de alfalfa), se realizaron dos incubaciones in vitro (tandas) utilizando la técnica de producción de gas (Hervás et al., 2005). El objetivo de estas incubaciones fue examinar el perfil lipídico del contenido ruminal a distintos tiempos de incubación (tras 0, 6 y 24 h), así como diferentes parámetros indicativos de la fermentación en el rumen (tras 24 h).

Para el estudio de los parámetros de la fermentación ruminal se utilizaron un total de 56 botellas [(2 tandas × 2 aceites × 2 sustratos × 2 réplicas/sustrato × 3 botellas/réplica) + (2 tandas × 1 blanco × 3 botellas/blanco) + (2 tandas × 1 botella de “tiempo 0”)].

Por su parte, para estudiar la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos se utilizaron otras 48 botellas (2 tandas × 2 aceites × 2 sustratos × 2 réplicas/sustrato × 1 botella/réplica × 3 tiempos).

Antes de iniciar las incubaciones, se preparó el medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970; ver Tabla 1), el cual contenía soluciones tampón, reductora, de macrominerales, de microminerales y de resazurina. La solución final se mantuvo en un baño de agua a 39,5 °C, gaseando con CO₂, durante aproximadamente 60 minutos (para asegurar su reducción).

Mientras tanto, se recolectó el líquido ruminal a través de las cánulas de las tres ovejas (la recolección se llevó a cabo antes de la administración de la comida de la mañana). Cada uno de los 3 inóculos se filtró con dos capas de gasa y se transportó inmediatamente al laboratorio, procurando conservar en lo posible sus condiciones de anaerobiosis y temperatura. Una vez en el laboratorio, los inóculos se volvieron a filtrar a través de una membrana de nailon (400 µm; Fisher-Scientific S.L., España) y en condiciones de anaerobiosis, y una mezcla proporcional de los tres inóculos se combinó con el medio de cultivo en una proporción 1:4 (v/v; fluido ruminal/medio de cultivo).

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo.

Soluciones (compuestos químicos)		Solución final (ml/l)	Concentración parcial (/l)
Solución tampón		208,1	
NH ₄ HCO ₃	(g)		4,00
NaHCO ₃	(g)		35,00
Solución reductora		0,1	
Cisteína-HCl	(g)		6,25
NaOH 1M	(ml)		40,00
Na ₂ S·9 H ₂ O	(g)		6,25
Solución de macrominerales		208,1	
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	(g)		9,45
KH ₂ PO ₄	(g)		6,20
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	(g)		0,60
Solución de microminerales		62,4	
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	(g)		1,32
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	(g)		1,00
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	(g)		0,10
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	(g)		0,80
Solución de resazurina		1,04	
Resazurina	(g)		0,01

Para la suplementación de los sustratos con los aceites, que se realizó justo antes de cada incubación, los aceites se disolvieron en etanol (1 g de aceite en 20 ml de etanol al 96%) y se sonicaron a 100 A durante 3 ciclos de 30 segundos (Ultraschallprozessor UP200H, Alemania). Después, se dosificaron 200 µl de la solución correspondiente en las botellas de incubación. A los blancos se les añadió únicamente el etanol.

En cada una de las botellas de incubación de 125 ml, en las que ya se habían pesado 500 mg de cada sustrato y dosificado un 2% de aceite de girasol o lino (según correspondía), se añadieron 50 ml de la mezcla (10 ml de fluido ruminal y 40 ml de medio de cultivo). A continuación, estas se cerraron herméticamente con tapones de caucho y anillas de aluminio y se introdujeron en un incubador (Mettmert UFP 500, Alemania) a 39,5 °C.

1.3.1. Parámetros indicativos de la fermentación ruminal

Durante la incubación, la producción de gas se registró a intervalos regulares (6, 12 y 24 horas post-incubación) mediante un transductor de presión (Gems Sensors 2200, Reino Unido) conectado a una pantalla (Data Track Process Instruments 223, Reino Unido). La presión almacenada (psi) se midió pinchando cada botella con una

aguja de 0,6 mm de diámetro (Sterican B. Braun, España) conectada al transductor. Posteriormente, el transductor se retiraba de la aguja y esta se mantenía insertada unos segundos en cada botella para permitir la salida de todo el gas acumulado en la misma. Tras cada lectura, las botellas se agitaban individualmente y se volvían a depositar en el incubador hasta la próxima lectura.

A partir de los valores de presión obtenidos, corregidos tanto para la cantidad de materia orgánica (MO) incubada como para la producción de gas de los blancos, se estimó el volumen de gas producido mediante la utilización de una ecuación de regresión lineal entre el volumen y la presión obtenida previamente a partir de numerosas medidas simultáneas de ambos parámetros ($n= 17\ 790$; Hervás et al., 2005).

Finalizada la incubación in vitro (i. e., 24 horas post-incubación), las botellas se sumergieron en agua y hielo picado para detener la fermentación, y se tomaron muestras para analizar una serie de parámetros indicativos de la fermentación ruminal.

En cada botella, se midió el pH mediante un pH-metro provisto de una sonda de vidrio (Crison Instruments GLP-22, España) y se tomaron 8 ml en tubos de 10 ml de capacidad que posteriormente se centrifugaron (3000 rpm, 10 min, 4 °C; Eppendorf 5415C, España) para eliminar cualquier sólido en suspensión. Cuatro ml del sobrenadante de cada muestra se acidificaron con 4 ml de HCl 0,2 N y se almacenaron a -30 °C hasta la determinación de la concentración de amoníaco. Así mismo, se recogieron 0,8 ml del sobrenadante de cada muestra en tubos Eppendorf de 2 ml de capacidad, se mezclaron con 0,5 ml de una solución desproteinizante (20 g/l de ácido metafosfórico disueltos en 0,5 ml de HCl 0,5 N, junto con 4 g/l de ácido crotónico) y se congelaron a -30 °C hasta el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV).

Una vez recogidas las muestras para amoníaco y AGV, el resto del contenido de cada botella se filtró utilizando crisoles de porosidad 1 (100-160 μm ; Pyrex, Reino Unido), con la ayuda de una bomba de vacío (KNF Neuberger VDE 0530, Alemania) y un baño de ultrasonidos (P-Selecta, España) cuando fue necesario. La desaparición de materia seca (DMS) se estimó introduciendo los crisoles en una estufa de aire forzado a 103 °C durante 24 horas. Sobre el residuo se analizó el contenido de fibra neutro

detergente (Van Soest et al., 1991) para estimar la digestibilidad verdadera in vitro (ivDV; Frutos et al., 2004a).

1.3.2. Biohidrogenación ruminal

La fermentación de las 48 botellas destinadas a estudiar la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos se detuvo tras 0, 6 y 24 horas post-incubación. Para ello, como se ha señalado previamente, estas se sumergieron en agua y hielo picado, se congelaron a -80 °C y, posteriormente, se liofilizaron (FTS LyoStar, Estados Unidos). El residuo resultante se homogenizó y se conservó a -80 °C hasta la determinación de su perfil lipídico.

2. ANÁLISIS QUÍMICOS

2.1. Alimentos

El análisis químico convencional de los alimentos, heno de alfalfa y heno de esparceta, se realizó en los laboratorios del IGM acreditados (Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005) por la Entidad Nacional de Acreditación (Acreditación ENAC N.º 907/LE1609).

El contenido de materia seca (MS) se determinó por desecación en una estufa de aire forzado (P Selecta, España) a 103 °C hasta peso constante (ISO 6496:1999). Posteriormente, la muestra seca se quemó en un horno-mufla (Hobersal 12-PR/400, España) a 550 °C durante 6 horas para determinar el contenido de cenizas (ISO 5984:2002).

El análisis de nitrógeno (N) se llevó a cabo en un autoanalizador Kjeltex (Foss KjeltexTM 2400, Suecia) y sulfato potásico y sulfato cúprico como catalizadores (ISO 5983-2:2009). El contenido de proteína bruta (PB) se obtuvo multiplicando el valor de N de cada muestra por el factor de conversión 6,25 ($PB = 6,25 \times N$).

Los contenidos de fibra neutro y ácido detergente (FND y FAD) y el de lignina ácido detergente (LAD) se determinaron secuencialmente en un analizador Ankom²⁰⁰⁰ (Ankom Technology Corp., Estados Unidos), de acuerdo con la metodología descrita por Van Soest et al. (1991) y las adaptaciones realizadas por Ankom (<https://ankom.com>).

El contenido de extracto etéreo (EE) se determinó mediante el sistema Ankom (*Ankom Filter Bag Technology*) y la técnica descrita por la AOCS (2008; Procedure Am 5-04).

El contenido de taninos totales (TT) en los henos de alfalfa y de esparceta se estimó mediante la técnica del Folin-Ciocalteu descrita por Makkar (2003b). Para ello, en primer lugar se eliminaron los pigmentos y los compuestos lipídicos que pudiesen contener las muestras mediante lavados consecutivos con una solución de éter dietílico con un 1% de ácido acético. Posteriormente, el residuo se secó en una estufa de aire forzado a 40 °C durante 2 horas y se realizaron dos extracciones consecutivas de los fenoles totales mediante la adición de 10 ml de acetona al 70% en cada una de ellas. A continuación, se tomó una alícuota de cada extracción para obtener un único extracto con el que se llevarían a cabo los análisis. Al extracto obtenido se le adicionó el reactivo Folin-Ciocalteu y una solución de bicarbonato sódico al 20% para proporcionar un medio alcalino. Se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV-1603, Japón) a 725 nm y la cantidad de fenoles totales se calculó a partir de una recta de calibración con ácido tánico (Merck, Alemania) como estándar de referencia (Makkar, 2003b). Para la determinación de los fenoles simples, el extracto que incluía los fenoles totales se sometió a un tratamiento con polivinilpolipirrolidona (PVPP; Sigma-Aldrich, Alemania) que provocó la precipitación de los taninos, quedando en el sobrenadante los fenoles simples. El contenido de estos se determinó de la misma forma descrita anteriormente para los fenoles totales. La diferencia entre los valores de fenoles antes y después del tratamiento con PVPP corresponde al contenido de TT de la muestra (expresado en equivalentes de ácido tánico).

2.2. Amoniac y ácidos grasos volátiles

La determinación de la concentración de amoniac se realizó por colorimetría de acuerdo con el método del salicilato descrito por Reardon et al. (1966).

La concentración de AGV (acético, propiónico, butírico, valérico, isobutírico e isovalérico) se analizó por cromatografía de gases (Carro et al., 1999), utilizando ácido crotonico (Merck, Alemania) como patrón interno. Para ello, las muestras se descongelaron a 4 °C, se centrifugaron (12 000 rpm, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se

recogió en viales de cromatografía hasta el momento de su análisis en la Universidad de León.

2.3. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos del contenido digestivo se analizó mediante cromatografía de gases siguiendo el método descrito por Shingfield et al. (2003).

La preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó siguiendo un procedimiento de extracción-transesterificación con cloroformo y ácido sulfúrico mezclado con metanol, incluyendo *cis*-12 13:1 (Larodan Fine Chemicals, Suecia) como estándar interno. Los lípidos de 200 mg de muestra liofilizada se extrajeron con 4 ml de una mezcla de hexano:2-propanol (3:2 v/v), tras el ajuste de pH de la digesta a 2 con HCl 2 N. Posteriormente, el extracto orgánico se evaporó bajo corriente de N a 50 °C. A continuación, los lípidos disueltos en 2 ml de hexano se metilaron (i. e., se transformaron en FAME) mediante una transesterificación ácido-básica con metóxido sódico 0,5 M en metanol, de 5 minutos a 20 °C, seguida de una reacción con ácido sulfúrico al 1% en metanol a 50 °C durante 30 minutos.

Para el análisis de los FAME se usó un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N, Estados Unidos) equipado con un inyector automático, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar CP-Sil (100 m × 0,25 mm; 0,20 µm; Varian, Holanda), utilizando hidrógeno como gas portador, aire sintético e hidrógeno como combustible y helio como gas auxiliar.

El perfil de los ácidos grasos metilados (FAME) en 2 µl de muestra líquida inyectada con un *split* de 1:50, se determinó usando el gradiente de temperatura descrito en Shingfield et al. (2003). Para conseguir un mejor análisis de los isómeros 18:1 se realizó otro análisis en condiciones isotermas a 170 °C (Shingfield et al., 2003). Los picos cromatográficos de las distintos FAME fueron identificados basándose en una mezcla de estándares comerciales (Larodan Fine Chemicals, Suecia; Nu-Chek Prep Inc., Estados Unidos; Sigma-Aldrich, España) y por comparación con muestras verificadas previamente mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) de los derivados 4,4-dimetiloxazolinicos (DMOX; e. g., Toral et al., 2010b).

Los AG identificados, de acuerdo con el orden correspondiente a los tiempos de retención, fueron los siguientes: 12:0, 13:0 *iso*, 13:0 *anteiso*, 13:0, 14:0 *iso*, *cis*-12 13:1 (estándar interno), 14:0, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 15:0, *trans* 15:1, 16:0 *iso*, 16:0, 17:0 *iso*, *cis*-6+7 16:1, *cis*-9 16:1, 17:0 *anteiso*, 3,7,11,15-tetrametil-16:0, *cis*-14 16:1, 17:0, 18:0 *iso*, 18:0, *trans*-4 18:1, *trans*-5 18:1, *trans*-6+7+8 18:1, *trans*-9 18:1, *trans*-10 18:1, *trans*-11 18:1, *trans*-12 18:1, *trans*-13+14 18:1, *cis*-9 18:1, *cis*-10 + *trans*-15 18:1, *cis*-11 18:1, *cis*-12 18:1, *cis*-13 18:1, *trans*-16 + *cis*-14 18:1, *cis*-15 18:1, *trans*-11 *trans*-15 18:2 (+ 19:0), *trans*-9 *trans*-12 18:2, 18:2 (geometría de los dobles enlaces no determinada), *cis*-9 *trans*-12 18:2, *cis*-16 18:1, *trans*-9 *cis*-12 18:2, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 *cis*-12 18:2, 20:0, 18:3n-6, *trans*-9 *trans*-12 *cis*-15 + *cis*-9 *cis*-12 *trans*-15 18:3, *cis*-9 *trans*-12 *cis*-15 18:3, *trans*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3, suma de isómeros 20:1 no resueltos, 18:3n-3 (+ *cis*-11 20:1), *cis*-9 *trans*-11 CLA, *trans*-9 *cis*-11 CLA, *trans*-10 *cis*-12 CLA, 21:0, *trans*-11 *trans*-13 CLA, suma de *trans*-8 *trans*-10, *trans*-9 *trans*-11 y *trans*-10 *trans*-12 CLA no resueltos, *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3, 22:0 20:3n-3, *cis*-13 22:1, 23:0, 24:0, 22:3n-6, *cis*-15 24:1, 10-oxo-18:0 y 13-oxo-18:0. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de una parte de un cromatograma y de la identificación de los diferentes picos.

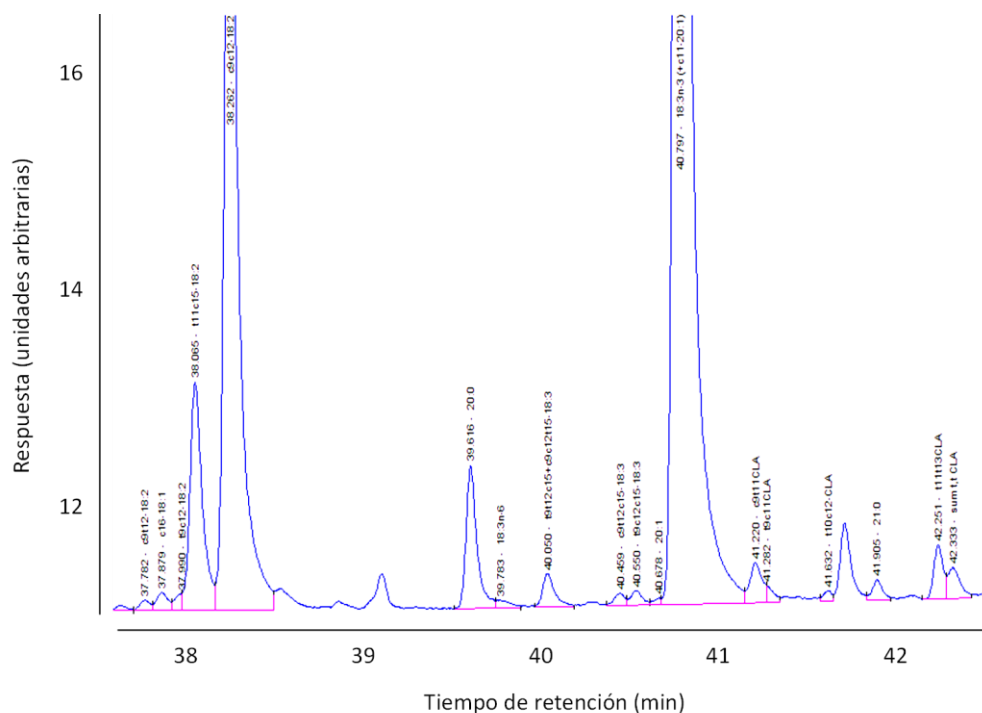


Figura 4. Sección parcial de un cromatograma obtenido a partir de una muestra de contenido ruminal. Se indican los tiempos de retención y la identificación de los ácidos grasos.

Para la preparación de los FAME de los henos y los aceites se siguió el procedimiento de extracción y transesterificación en una etapa utilizando cloroformo (Sukhija y Palmquist, 1988) y 20 ml/l de ácido sulfúrico en metanol (Shingfield et al., 2003).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados, por separado para cada aceite, tal y como se explica en el capítulo previo, se llevó a cabo con el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS (versión 9.4; SAS Inst. Inc., Estados Unidos), incluyendo en el modelo el efecto fijo del tipo de sustrato (alfalfa vs. esparceta). Dado que el diseño experimental no contemplaba 4 réplicas estrictas sino que, como ya se ha indicado, había 2 réplicas de cada sustrato más otras 2 de las tandas de incubación, se consultó con la Dra. Laura Barrios del Departamento de Bioestadística del CSIC la mejor manera de incluirlas en el modelo. Siguiendo sus recomendaciones, la réplica de cada sustrato se anidó al propio sustrato y se consideró además la interacción entre este componente (i. e., réplica anidada al sustrato) y la tanda de incubación como efecto aleatorio (*random*).

Se admitieron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con un nivel de significación inferior al 5% ($P < 0,05$), considerándose $P < 0,10$ una tendencia a la significación.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PERFIL LIPÍDICO DE LOS HENOS Y DE LOS ACEITES

En la Tabla 2 se muestran los resultados relativos a la composición química de los dos henos estudiados (el de alfalfa y el de esparceta) y a su perfil lipídico. Como puede comprobarse, ambos aportaron prácticamente la misma cantidad de PB, aunque los contenidos de FND, FAD y LAD fueron numéricamente algo superiores en la esparceta. La principal diferencia entre ambos radicó, como se contemplaba en el diseño de la prueba, en el contenido de taninos totales, ya que estos fueron muy bajos en la alfalfa (0,5%, expresados en equivalentes de ácido tánico), con lo cual podría considerarse un forraje prácticamente sin taninos, y de 3,5% en la esparceta.

Tabla 2. Composición química y perfil de ácidos grasos (media \pm error estándar de la media) de los henos de alfalfa y esparceta utilizados como sustrato en los cultivos in vitro¹.

	Alfalfa	Esparceta
Composición química²		
(g/kg MS, excepto para la propia MS que es g/kg de materia fresca)		
MS	901 \pm 5,2	925 \pm 1,3
MO	878 \pm 0,7	914 \pm 3,3
PB	189 \pm 3,6	182 \pm 2,9
FND	321 \pm 19,7	377 \pm 0,4
FAD	247 \pm 12,6	295 \pm 0,8
LAD	44 \pm 2,6	54 \pm 2,7
EE	26 \pm 2,4	23 \pm 4,6
TT ³	5 \pm 1,1	35 \pm 1,0
Perfil de ácidos grasos (g/100 g AG totales)		
12:0	0,7 \pm 0,03	0,2 \pm 0,01
14:0	2,4 \pm 0,12	1,9 \pm 0,08
16:0	25,0 \pm 0,04	23,3 \pm 0,54
18:0	5,6 \pm 0,15	4,2 \pm 0,84
<i>cis</i> -9 18:1	2,3 \pm 0,17	3,6 \pm 0,36
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	14,0 \pm 0,27	14,8 \pm 0,52
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	41,1 \pm 0,02	42,7 \pm 2,34
Resumen⁴		
SFA	41,1 \pm 0,47	37,3 \pm 1,35
MUFA	3,5 \pm 0,09	4,8 \pm 0,39
PUFA	55,3 \pm 0,38	57,9 \pm 1,74

¹n=2.

²MS= materia seca; MO= materia orgánica; PB= proteína bruta; FND= fibra neutro detergente; FAD= fibra ácido detergente; LAD= lignina ácido detergente; EE= extracto etéreo; TT= taninos totales.

³Expresados en equivalentes de ácido tánico.

⁴SFA= ácidos grasos saturados; MUFA= ácidos grasos monoinsaturados; PUFA= ácidos grasos poliinsaturados.

En principio, el contenido de taninos de la esparceta estaría por debajo del nivel del 5% que en muchas publicaciones se ha considerado repetidamente como negativo para los rumiantes. Sin embargo, esta generalización deriva de trabajos realizados con especies de *Lotus* y resulta totalmente incorrecta cuando se aplica a otras especies vegetales (Mueller-Harvey, 2006). Además, en muy pocas ocasiones se tiene en cuenta que la falta de estandarización tanto del compuesto en el que se expresa la concentración (ácido tánico, quebracho, catequinas, taninos extraídos de la propia especie, etc.) como del método de análisis, hacen que las comparaciones de los contenidos no tengan ningún sentido biológico (Makkar, 2003a; Álvarez del Pino et al., 2005).

Por último en lo que al contenido de taninos se refiere, aunque en la comparación de los henos de alfalfa y esparceta la mayor parte de las diferencias se atribuyen al papel de estos metabolitos secundarios, no puede olvidarse que la composición de ambos forrajes es muy similar pero no idéntica. Por ende, las pequeñas variaciones en su composición química podrían tener cierta implicación en algunos de los parámetros estudiados.

En cuanto al perfil lipídico, aunque la esparceta parece aportar ligeramente menos ácidos grasos saturados y más poliinsaturados, en general son bastante similares.

No ocurre lo mismo con la composición de los aceites de girasol y de lino (ver Tabla 3), ya que a pesar de las concentraciones parejas de 14:0, 16:0 y 18:0, el primero contiene un 61% de ácido linoleico y un 25% de oleico, en tanto que el segundo, el de lino, se caracteriza básicamente por una elevada cantidad (55%) de linolénico, AG n-3 que apenas se detecta en el girasol, junto con un 18% de oleico y un 16% de linoleico. Esta composición, relativamente constante en estos aceites (Glasser et al., 2008; Toral et al., 2010a), formaba parte del diseño experimental y explica el análisis separado de los tratamientos.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de los aceites de girasol y lino.

	Ac. girasol ¹	Ac. lino ²
Perfil de ácidos grasos (g/100 g AG totales)		
14:0	0,1	0,1
16:0	6,5	6,0
18:0	3,9	4,1
<i>cis</i> -9 18:1	24,8	17,6
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	61,3	15,6
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	<0,1	54,5

¹Carrefour S.A. (España).²Vandeputte Oléochemicals S.A. (Bélgica).

2. BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Antes de nada, quizás conviene mencionar que el uso de una metodología basada en un sistema cerrado (como es la de los cultivos discontinuos de microorganismos ruminales) permite detectar con facilidad los efectos de los compuestos secundarios de las plantas. Esto ha resultado muy útil en la identificación de la acción de los taninos sobre diferentes parámetros de fermentación ruminal (Getachew et al., 2000; Frutos et al., 2004a; Rodríguez et al., 2011). Sin embargo, según la experiencia del equipo de investigación implicado en la realización de este trabajo, el efecto de los taninos sobre el proceso de BH ruminal no resulta más patente en los estudios in vitro que en los in vivo (e. g., Benhissi et al., 2013b; Toral et al., 2013; Carriño et al., 2015). De todas formas, es importante tener siempre en consideración que los estudios in vitro resultan de enorme utilidad en el trascurso de la investigación (para *screening*, examen de mecanismos concretos de acción, etc.) pero sus resultados necesitan, en la mayor parte de los casos, ser corroborados después en pruebas in vivo.

En las Tablas 4 y 5 se presenta la información relativa al perfil de AG del contenido ruminal, con especial atención al de aquellos de 18 carbonos. Parte de esta información se muestra también en gráficas (Figuras 5 y 6) para facilitar su comprensión.

Tabla 4. Concentraciones de diversos ácidos grasos de cadena larga del contenido ruminal (g/100 g AG totales) tras 0, 6 y 24 h de incubación con aceite de girasol.

	Tiempo (h)	Alfalfa	Esparceta	eed ¹	P ²
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	0	7,98	8,74	0,935	ns
	6	6,59	7,20	0,311	ns
	24	3,22	4,57	0,789	ns
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	0	35,95	38,73	3,149	ns
	6	21,01	24,75	0,935	*
	24	4,98	8,44	1,403	t
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	0	0,08	0,07	0,020	ns
	6	0,63	0,50	0,032	*
	24	0,36	0,62	0,077	*
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2	0	0,09	0,08	0,015	ns
	6	0,61	0,61	0,080	ns
	24	0,49	0,61	0,078	ns
CLA total ³	0	0,34	0,26	0,048	ns
	6	1,36	1,26	0,149	ns
	24	1,84	2,19	0,143	t
<i>trans</i> -11 18:1	0	0,79	0,54	0,214	ns
	6	6,80	5,44	0,822	ns
	24	11,59	12,89	0,564	t
<i>trans</i> -10 18:1	0	0,07	0,06	0,016	ns
	6	0,29	0,26	0,044	ns
	24	0,53	0,66	0,108	ns
<i>cis</i> -9 18:1	0	14,70	15,90	1,181	ns
	6	10,06	11,48	0,607	t
	24	5,82	8,16	1,140	ns
18:0	0	14,00	11,61	2,235	ns
	6	21,40	19,60	0,715	t
	24	35,00	26,42	5,234	ns
10-oxo-18:0	0	0,08	0,08	0,030	ns
	6	0,14	0,13	0,018	ns
	24	0,40	0,28	0,025	**
ΣOBCFA ³	0	3,21	3,09	0,473	ns
	6	3,99	3,89	0,427	ns
	24	5,90	5,76	0,370	ns
ΣSFA ³	0	36,18	32,24	3,641	ns
	6	45,73	42,46	1,768	ns
	24	62,51	53,26	4,493	ns
ΣMUFA ³	0	18,17	18,99	1,028	ns
	6	23,18	22,53	1,044	ns
	24	25,63	29,40	2,232	ns
ΣPUFA ³	0	45,37	48,53	2,790	ns
	6	30,70	34,66	0,858	*
	24	11,28	16,76	2,430	t

¹eed= error estándar de la diferencia.²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); t, P<0,10; *, P<0,05; **, P<0,01.³CLA= ácido linoleico conjugado; OBCFA= ácidos grasos impares y ramificados; SFA= ácidos grasos saturados (n= 25); MUFA= ácidos grasos monoinsaturados (n= 30); PUFA= ácidos grasos poliinsaturados(n= 23).

Tabla 5. Concentraciones de diversos ácidos grasos de cadena larga del contenido ruminal (g/100 g AG totales) tras 0, 6 y 24 h de incubación con aceite de lino.

	Tiempo (h)	Alfalfa	Esparceta	eed ¹	P ²
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	0	36,76	38,55	0,595	*
	6	20,97	24,09	0,622	**
	24	5,33	7,12	1,787	ns
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	0	12,16	12,22	0,180	ns
	6	7,94	8,71	0,286	t
	24	2,89	3,29	0,776	ns
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	0	0,08	0,08	0,008	ns
	6	1,71	1,39	0,208	ns
	24	1,77	2,04	0,218	ns
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2	0	0,13	0,11	0,015	ns
	6	0,32	0,32	0,057	ns
	24	0,14	0,20	0,031	ns
CLA total ³	0	0,40	0,32	0,042	ns
	6	1,20	1,04	0,210	ns
	24	1,25	1,32	0,081	ns
<i>trans</i> -11 18:1	0	0,57	0,58	0,026	ns
	6	5,41	4,43	0,180	**
	24	8,55	10,10	0,587	t
<i>trans</i> -10 18:1	0	0,06	0,05	0,012	ns
	6	0,23	0,25	0,039	ns
	24	0,45	0,49	0,087	ns
<i>cis</i> -9 18:1	0	10,31	11,08	0,141	**
	6	7,57	8,86	0,354	*
	24	4,61	5,36	0,664	ns
18:0	0	13,35	12,87	0,533	ns
	6	22,35	20,62	1,166	ns
	24	35,34	31,72	6,286	ns
10-oxo-18:0	0	0,09	0,08	0,007	ns
	6	0,13	0,12	0,019	ns
	24	0,32	0,28	0,044	ns
ΣOBCFA ³	0	3,50	3,28	0,127	ns
	6	4,25	3,75	0,168	*
	24	6,06	5,89	0,653	ns
ΣSFA ³	0	35,76	33,55	0,700	*
	6	46,00	42,52	0,797	*
	24	62,95	58,44	4,897	ns
ΣMUFA ³	0	13,40	14,12	0,101	**
	6	19,48	19,83	0,553	ns
	24	23,06	25,08	2,165	ns
ΣPUFA ³	0	50,58	52,08	0,704	ns
	6	34,02	37,22	0,440	**
	24	13,09	15,69	2,794	ns

¹eed= error estándar de la diferencia.²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); t, P<0,10; *, P<0,05; **, P<0,01.³CLA= ácido linoleico conjugado; OBCFA= ácidos grasos impares y ramificados; SFA= ácidos grasos saturados (n= 25); MUFA= ácidos grasos monoinsaturados (n= 30); PUFA= ácidos grasos poliinsaturados(n= 23).

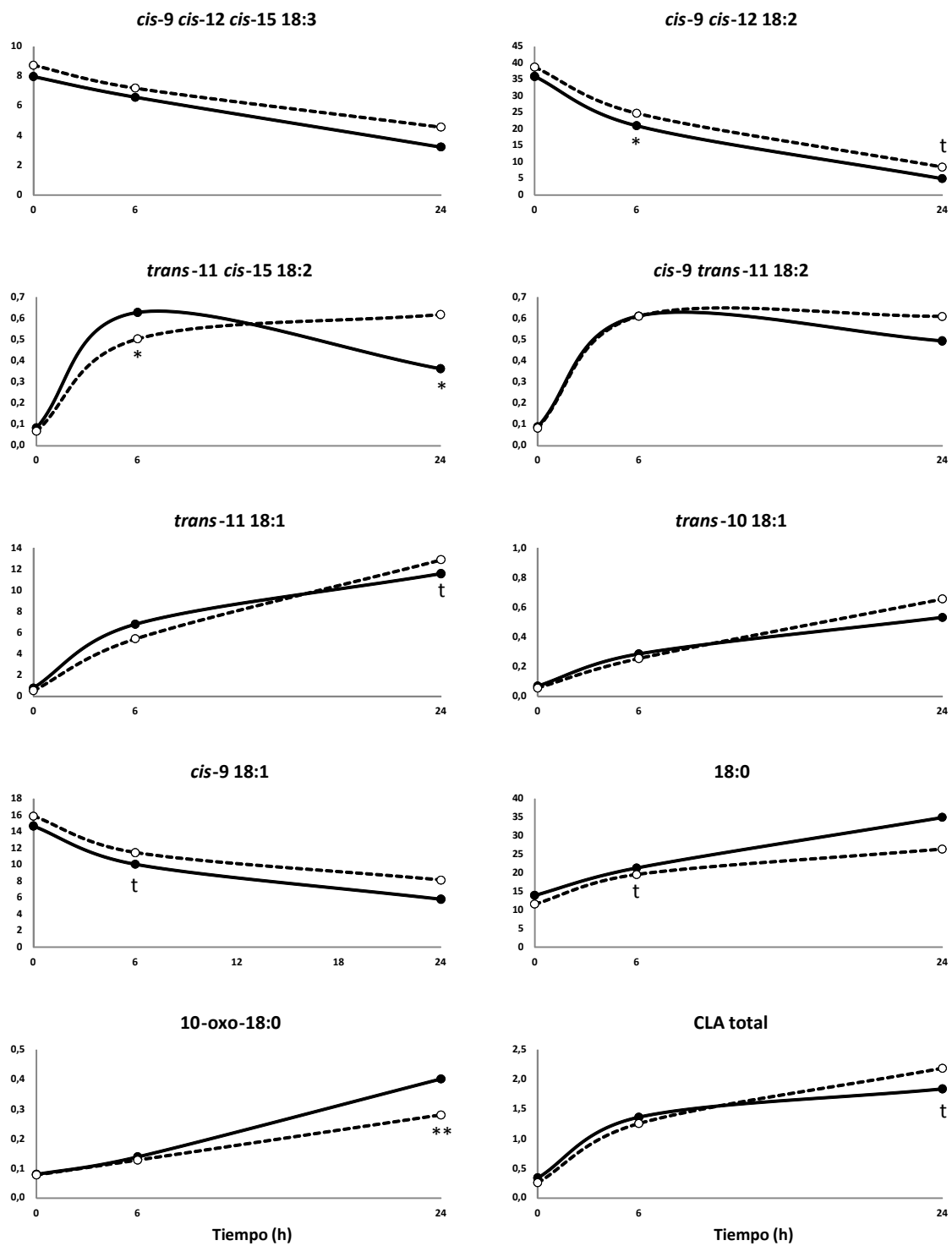


Figura 5. Evolución (horas 0, 6 y 24) de las concentraciones (g/100 g AG totales) de diversos AG en las incubaciones de alfalfa (línea continua) y esparceta (línea discontinua) suplementadas con un 2% de aceite de girasol.

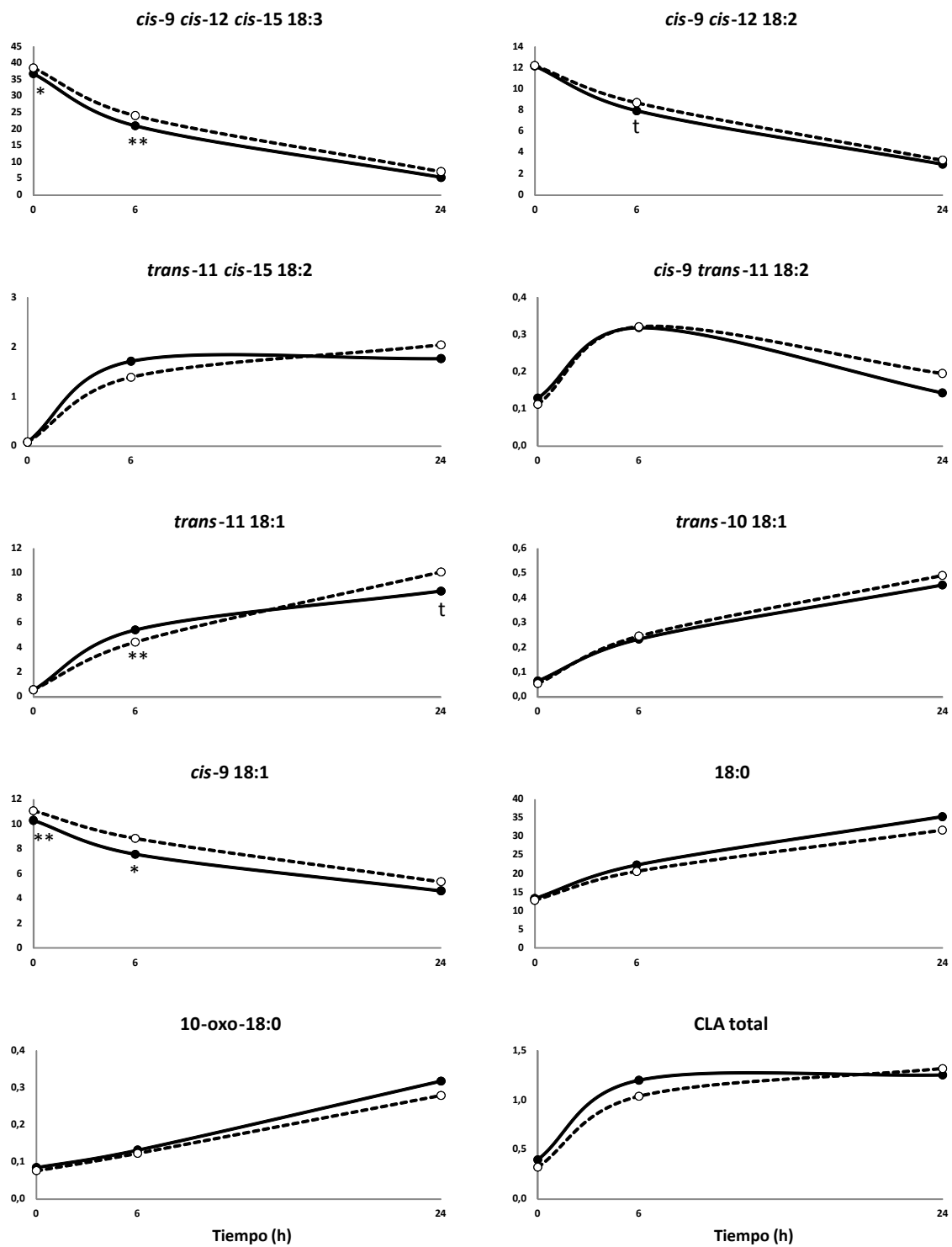


Figura 6. Evolución (horas 0, 6 y 24) de las concentraciones (g/100 g AG totales) de diversos AG en las incubaciones de alfalfa (línea continua) y esparceta (línea discontinua) suplementadas con un 2% de aceite de lino.

Aunque en el cromatograma se integraron e identificaron otros muchos AG (n= 78, como se señala en el capítulo de Material y Métodos), en las tablas se presenta un perfil parcial que corresponde a aquellos de mayor relevancia en relación con los objetivos del trabajo. Por otro lado, en este capítulo no se va a hacer ninguna mención al efecto de la suplementación con aceites de girasol y de lino puesto que esto no se contempla en el diseño experimental de la prueba.

Como puede observarse en la Tabla 4, cuando la dieta se suplementó con aceite de girasol, la concentración de LA a las 6 y 24 horas de incubación fue más alta en las incubaciones de esparceta ($P<0,05$ y $P<0,10$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el LNA ($P>0,10$). Prácticamente lo contrario se detectó en la dieta suplementada con aceite de lino; es decir, que los porcentajes de LNA fueron superiores en la esparceta ($P<0,05$) pero no hubo variaciones significativas en los de LA. Si se tiene en cuenta la composición lipídica de uno y otro aceite, parece que el efecto inhibidor de la BH, ejercido posiblemente por los taninos de la esparceta, sería más patente sobre el AG mayoritario de cada suplemento (LA en el aceite de girasol y LNA en el de lino). Sin embargo, es importante no perder de vista el hecho de que en cada momento (0, 6 y 24 horas) se está tomando una “foto fija” de un proceso en evolución continua y, por lo tanto, cualquier resultado ha de ser considerado con precaución y dentro del marco general de la BH en su conjunto. En este sentido, por ejemplo, los cambios en el *trans*-11 *cis*-15 18:2 (uno de los principales metabolitos de la BH del LNA) solo fueron significativos en las incubaciones con girasol.

En cualquier caso, todos estos resultados confirmarían la inhibición que causan los taninos sobre la BH de los AG insaturados de la dieta y justifican el estudio de su empleo para mejorar el perfil lipídico de la leche y la carne de los rumiantes (Torral et al., 2013; Vasta y Luciano, 2011; Girard et al., 2015).

Aunque podría esperarse algo diferente, ni el *cis*-9 *trans*-11 18:2, ni el CLA total se vieron afectados significativamente por el tratamiento, aunque en las incubaciones con girasol a 24 h se observó una tendencia ($P<0,10$) a un mayor contenido en la esparceta. También este resultado coincidiría con el efecto negativo de los taninos sobre la BH ruminal e iría a favor del uso de forrajes con taninos para modificar el metabolismo de los AG insaturados en el rumen.

En lo que se refiere al *trans*-11 18:1, un AG especialmente deseable por su papel como precursor del *cis*-9 *trans*-11 CLA en la glándula mamaria o el músculo de los rumiantes o incluso en los tejidos de los consumidores (Palmquist et al., 2005; Bichi et al., 2012), la variación atribuible al efecto de los taninos de la esparceta no siguió un patrón regular. Así, los datos relativos a las incubaciones de 24 h con aceite de girasol (superiores en el caso de la esparceta; $P < 0,10$) apoyarían la teoría sugerida por algunos autores de que los taninos inhiben fundamentalmente el último paso de la BH, aumentando así la acumulación de VA en el rumen y su flujo posterior al intestino (Vasta et al., 2009; Buccioni et al., 2011). Sin embargo, los datos relativos a las incubaciones de 6 y 24 h con aceite de lino, son un buen ejemplo de la controversia existente acerca del efecto de estos compuestos fenólicos sobre el último paso de la BH. En este sentido, a las 6 h los valores fueron significativamente inferiores en el caso de la esparceta ($P < 0,01$) pero esta tendencia se invirtió a las 24 h, con valores más altos en este forraje ($P < 0,10$). Sería arriesgado, de todas formas, negar que estos cambios estén relacionados con el efecto de los taninos sobre la BH, ya que una inhibición del último paso aumentaría su contenido pero una inhibición de los primeros pasos lo reduciría. Aumentos en las concentraciones de 18:3n-3 y 18:2n-6 acompañados por descensos en las de RA y VA han sido observados, por ejemplo, por Addis et al. (2005) y Cabiddu et al. (2009) en sus experimentos sobre la zulla. También Turner et al. (2005) y Girard et al. (2015) señalaron resultados similares trabajando con *Lotus corniculatus*.

Sorprendentemente, aunque cabría esperar que el efecto inhibitor de los taninos sobre la BH, ya sea sobre el proceso en su conjunto o sobre el último paso, se reflejara en una menor acumulación de 18:0 en el rumen, en este experimento no se observó una variación significativa ($P > 0,10$). Así, a pesar de que los resultados numéricos sí parecen corroborar lo esperado (i.e., valores más bajos en las incubaciones de esparceta), estos solo alcanzaron el nivel de significación $P < 0,10$ en las botellas detenidas a las 6 h y suplementadas con aceite de girasol.

En cuanto al *trans*-10 18:1, cuyo papel no solo sobre la salud de los consumidores sino también sobre el rendimiento productivo de los animales aún es incierto (Shingfield et al., 2008b), no se observaron diferencias significativas en ningún

caso. Este isómero de los 18:1 tiende a aumentar en grandes proporciones con ciertas estrategias nutricionales basadas en la suplementación de la dieta por ejemplo con lípidos de origen marino (Boeckaert et al., 2008; Toral et al., 2010a) y puede, sobre todo en el vacuno, llegar a sobrepasar los contenidos de *trans*-11 18:1 (Chilliard et al., 2007). Esta transición en la relación *trans*-11 18:1/*trans*-10 18:1 es un claro indicativo de una elevada perturbación del ambiente ruminal.

En lo que se refiere al ácido oleico, otro isómero 18:1, su concentración fue siempre numéricamente superior en las incubaciones de esparceta, aunque en varios casos (con girasol a las 0 y 24 h y con lino a las 24 h) no alcanzara el nivel de significación $P < 0,10$. De todas maneras, también el comportamiento de este AG apuntaría a un efecto inhibitor de los taninos de la esparceta que podría resultar beneficioso para modular el perfil lipídico de la carne y la leche de los rumiantes (Khiaosa et al., 2009; Vasta y Luciano, 2011).

En las tablas se muestran asimismo los contenidos de 10-oxo-18:0, un metabolito procedente de la hidratación y oxidación de los AG de la dieta (una vía alternativa a la BH ruminal). Aunque este ácido graso solo suele aparecer en perfiles bastante completos, es un buen indicador de alteraciones en el rumen (Toral et al., 2010b, 2012). En nuestras incubaciones, sin embargo, no se detectó ninguna variación significativa ($P > 0,10$).

Esto coincide con la ausencia de diferencias en la mayor parte de las concentraciones de ácidos grasos de cadena impar o ramificados (OBCFA), con la única excepción de las incubaciones con lino a las 6 h ($P < 0,01$). El sumatorio de dichos OBCFA, que se han utilizado también como biomarcadores de la microbiota ruminal (Fievez et al., 2012), se presenta en las Tablas 4 y 5. Sin embargo, tanto sobre este Σ OBCFA como sobre los de AG saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Σ SFA, Σ MUFA y Σ PUFA) es conveniente hacer la siguiente consideración: el hecho de ser sumatorios implica que muchos de sus AG individuales podrían estar mostrando un comportamiento antagónico, es decir que mientras unos aumentan, otros podrían mantenerse constantes o disminuir en respuesta al mismo factor de variación. Por lo tanto, los resultados deben interpretarse con precaución. Además, dichos sumatorios corresponden a todos los AG identificados y no solo a los de 18C.

Las variaciones en estos grandes grupos fueron más claras en las incubaciones con aceite de lino que en las de girasol. En estas últimas, el efecto beneficioso de la esparceta solo fue significativo en el caso de los PUFA. Por el contrario, cuando las dietas se suplementaron con LNA, el efecto positivo se detectó también (aunque no alcanzó siempre con una $P < 0,10$) en valores menores de los SFA. El hecho de que el mayor contenido de los MUFA solo se detectara a las 0 h ($P < 0,10$) no permite atribuirlo a los taninos de la esparceta, ya que a este tiempo el efecto conjunto de otros factores (por ejemplo, de las pequeñas diferencias en el perfil lipídico de los henos o en el del inóculo ruminal) podría tener un mayor peso.

En cualquier caso, el menor contenido de SFA también debe tomarse con precaución, ya que a pesar de la generalización de su carácter potencialmente perjudicial para la salud, por el incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Lock et al., 2008), esto solo es estrictamente aplicable al 12:0, 14:0 y 16:0, en tanto que otros como el 18:0 serían inocuos y, por ejemplo, el 4:0 es claramente beneficioso (Frutos et al., enviado).

En conjunto, el estudio muestra la capacidad de la esparceta, posiblemente atribuible a su contenido de taninos, para modificar la BH ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta, lo cual podría redundar en una mejora del perfil lipídico de los productos finales (carne y leche). Sin embargo, los resultados observados in vitro no son tan prometedores como cabría esperar a priori o como se han conseguido con otras estrategias nutricionales.

3. FERMENTACIÓN RUMINAL

En las Tablas 6 y 7 se presentan los resultados de los parámetros de fermentación ruminal analizados tras 24 horas de incubación in vitro. El motivo para realizar esta parte del estudio fue que, en caso de que se detectase un efecto beneficioso de los taninos de la esparceta sobre el proceso de BH de los ácidos grasos de la dieta y su aplicación resultara de interés práctico, se pudiera descartar una posible acción negativa sobre la fermentación ruminal. Este punto se consideraba de especial relevancia ya que una alteración de la digestión en el rumen podría perjudicar

seriamente a la utilización digestiva de la dieta y, consecuentemente, al rendimiento productivo de los animales.

Tabla 6. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de girasol.

	Alfalfa	Esparceta	eed ¹	P ²
Gas (ml/g MO)	239	203	4,5	**
DMS (%)	60,8	57,0	1,25	*
ivDV (%)	72,1	65,3	0,67	***
pH	6,77	6,74	0,006	**
Amoníaco (mg/l)	326	263	13,2	**
AGV total (mmol/l)	52,6	47,8	1,56	*
<i>Proporciones molares</i>				
Acético	69,5	72,7	1,37	t
Propiónico	20,2	20,9	0,52	ns
Butírico	6,1	4,3	0,51	*
Valérico	1,8	0,8	0,27	*
Isoácidos	2,4	1,3	0,81	ns
Relación A/P	3,44	3,49	0,106	ns

¹eed= error estándar de la diferencia.

²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); t, P<0,10; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001.

Tabla 7. Producción de gas, desaparición de materia seca (DMS), digestibilidad verdadera in vitro (ivDV), pH, concentración de amoníaco, producción de ácidos grasos volátiles totales (AGV total), proporciones molares de acético, propiónico, butírico, valérico e isoácidos, y relación acético/propiónico (A/P) tras 24 h de incubación con aceite de lino.

	Alfalfa	Esparceta	eed ¹	P ²
Gas (ml/g MO)	243	198	7,1	**
DMS (%)	59,1	57,9	2,45	ns
ivDV (%)	70,9	66,1	0,95	**
pH	6,76	6,74	0,006	*
Amoníaco (mg/l)	332	245	15,1	**
AGV total (mmol/l)	52,6	46,0	1,44	*
<i>Proporciones molares</i>				
Acético	69,8	72,6	1,41	ns
Propiónico	19,9	21,8	0,96	ns
Butírico	6,2	3,8	0,72	*
Valérico	1,8	0,8	0,31	*
Isoácidos	2,4	1,1	0,88	ns
Relación A/P	3,52	3,34	0,168	ns

¹eed= error estándar de la diferencia.

²Probabilidad: ns, no significativo (P>0,10); *, P<0,05; **, P<0,01.

Tanto en las incubaciones con aceite de girasol como en las de lino, se observó que la producción de gas y la digestibilidad verdadera *in vitro* eran inferiores en la esparceta. Cuando la dieta se suplementó con aceite de girasol, la reducción numérica de la desaparición de MS también resultó significativa ($P < 0.05$). Estos resultados coinciden con los observados por muchos otros autores cuando se utilizan taninos (e. g., Getachew et al., 2000; Frutos et al., 2004a; Rodríguez et al., 2011) y han sido atribuidos fundamentalmente a su efecto inhibitorio de la capacidad de adhesión de las bacterias ruminales a las partículas de alimento (McAllister et al., 1994), así como de su crecimiento y actividad enzimática (McSweeney et al., 2003; Smith et al., 2005). También Lobón et al. (2015) encontraron una menor producción de gas en la esparceta que en la alfalfa cuando ambas se incubaron *in vitro* con inóculo ruminal de ovino, aunque cabe destacar que la calidad de su alfalfa era mucho más baja que la de la utilizada en este experimento. Los datos de *ivDV* deben tomarse con precaución dada la posible interferencia de los taninos en el análisis (Frutos et al., 2004a).

En todo caso, es importante tener en cuenta que los efectos de los taninos sobre la fermentación ruminal, tal y como sucede con la BH, pueden ser muy variables dependiendo del tipo de tanino, la dosis utilizada, la adaptación de los animales a su consumo, etc. (Doce et al., 2009; Benhissi et al., 2013a; Carreño et al., 2015). Por otra parte, tampoco puede olvidarse que se están comparando dos forrajes con una composición química similar pero no idéntica.

Aunque los valores de pH resultaron significativamente más bajos en las incubaciones con esparceta ($P < 0.05$), no cabe esperar que variaciones de 2 o 3 centésimas tengan ningún significado o implicación biológica. En cambio, las concentraciones de amoníaco sí mostraron un valor significativamente inferior ($P < 0.01$) en el tratamiento que contenía taninos, tanto en los cultivos en los que se añadió girasol (-19%) como en aquellos con lino (-26%). Estos resultados confirmarían la conocida inhibición que ejercen los taninos sobre la proteólisis ruminal de la proteína de la dieta, lo cual se refleja en una menor concentración de amoníaco y deriva de la especial afinidad de los grupos hidroxilo de los taninos y los carbonilo de las proteínas (McLeod, 1974; Mueller-Harvey y McAllan, 1992). Esta característica es posiblemente la mejor documentada de estos compuestos fenólicos en lo que se

refiere a su uso en la nutrición de los rumiantes (Frutos et al., 2004b; Mueller-Harvey, 2006). Es interesante señalar que aunque se trate de una inhibición, no puede considerarse un efecto “antinutricional” ya que, dependiendo del tipo de dieta, puede resultar claramente beneficioso para el animal, al aumentar el aporte al intestino de proteína no degradada en el rumen. Estos resultados coinciden con los observados en un estudio *in vitro* llevado a cabo con inóculo ruminal procedente de vacas alimentadas con ensilado de alfalfa o de esparceta (Romero-Pérez et al., 2011).

Otro caso distinto es el de los AGV, principal fuente de energía de los rumiantes, puesto que su disminución en los cultivos con taninos implicaría una desventaja nutricional. Como puede observarse en las Tablas 6 y 7, la concentración de AGV totales de la esparceta fue, de media, un 10,8% más baja que la de los de alfalfa ($P<0.05$), y las proporciones molares que más reflejaron esta caída correspondieron al butírico y el valérico. Al contrario de lo que ocurre con el amoníaco, donde la inmensa mayoría de los trabajos coinciden en el efecto inhibidor de los taninos, las publicaciones sobre la respuesta de los AGV a la presencia de estos metabolitos secundarios en la dieta son sumamente variables, de modo que hay artículos que señalan aumentos, descensos o ausencia de variaciones en la producción (e. g., Hervás et al., 2003; Tiemann et al., 2008; Romero-Pérez et al., 2011). Estas discrepancias son aún más patentes cuando se trata de especificar el AGV que puede o no variar. Además, en este caso tampoco puede descartarse que los efectos no sean debidos a los taninos sino también a las diferencias entre los sustratos en su composición química, especialmente en lo relativo a la pared celular (Van Soest, 1994).

Por otra parte, muchos estudios (e. g., Benchaar et al., 2008; Doce et al., 2009) coinciden en que el valérico y los isoácidos mostrarían un comportamiento paralelo al del amoníaco, ya que derivan de la descarboxilación y desaminación de determinados aminoácidos. En esta prueba, esto serviría para explicar el menor valor del valérico ($P<0.05$) pero contrastaría con la ausencia de diferencias significativas en los isoácidos ($P>0.10$), aunque esta fue probablemente debida a una elevada variación individual. Tampoco se detectaron diferencias entre la alfalfa y la esparceta en la relación acético/propiónico ($P>0.10$).

VI. CONCLUSIONES

La mayor parte de los resultados relativos a los metabolitos intermedios de la biohidrogenación in vitro (por ejemplo, mayores concentraciones de 18:3n-3, 18:2n-6, *trans*-11 *cis*-15 18:2, *cis*-9 18:1 o ácidos grasos poliinsaturados totales en las incubaciones del heno de esparceta) muestran la capacidad de *Onobrychis viciifolia*, posiblemente atribuible a su contenido de taninos, para inhibir la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta. Por otra parte, en las condiciones de este ensayo, no se detectan diferencias significativas entre los henos de alfalfa y de esparceta en la acumulación de *cis*-9 *trans*-11 18:2, CLA total o 18:0, y la variación en el *trans*-11 18:1 no sigue un patrón regular.

En cuanto a la fermentación ruminal in vitro, la producción de gas es inferior en las incubaciones del heno de esparceta, lo cual coincide con el efecto esperable de los taninos. En esta misma línea, la concentración de amoníaco y la producción de ácidos grasos volátiles totales también son más bajas en los cultivos de esta leguminosa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbeddou, S., Rischkowsky, B., Richter, E.K., Hess, H.D., Kreuzer, M. 2011. Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. *Journal of Dairy Science*, 94:4657-4668.
- Addis, M., Cabiddu, A., Pinna, G., Decandia, M., Piredda, G., Pirisi, A., Molle, G. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. *Journal of Dairy Science*, 88:3443-3454.
- Álvarez del Pino, M.C., Hervás, G., Mantecón, A.R., Giráldez, F.J., Frutos, P. 2005. Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrubs species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:583-590.
- AOCS. 2008. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 5th ed. (2nd printing). AOCS, Urbana, IL, USA.
- Asquith, T.N., Butler, L.G. 1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry*, 25:1591-1593.
- Atkinson, R.L., Scholljegerdes, E.J., Lake, S.L., Nayigihugu, V., Hess, B.W., Rule, D.C. 2006. Site and extent of digestion, duodenal flow, and intestinal disappearance of total and esterified fatty acids in sheep fed a high-concentrate diet supplemented with high-linoleate safflower oil. *Journal of Animal Science*, 84:387-396.
- Benchaar, C., McAllister, T.A., Chouinard, P.Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *Journal of Dairy Science*, 91:4765-4777.
- Benhissi, H., Frutos, P., Toral, P.G., Belenguer, A., Hervás, G. 2013a. Use of tannins to modify ruminal biohydrogenation in sheep. 1) Effects on in vitro rumen fermentation. *Options Méditerranées A*, 107:17-21.
- Benhissi, H., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P. 2013b. Use of tannins to modify ruminal biohydrogenation in sheep. 2) Effects on in vitro fatty acid composition of rumen digesta. *Options Méditerranées A*, 107:23-27.
- Bichi, E., Toral, P.G., Hervás, G., Frutos, P., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A. 2012. Inhibition of $\Delta 9$ -desaturase activity with sterculic acid: Effect on the endogenous synthesis of cis-9 18:1 and cis-9, trans-11 18:2 in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 95:5242-5252.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., Fievez, V. 2008. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal Dairy Science*, 91:4714-4727.
- Bonanno, A., Di Grigoli, A., Montalbano, M., Bellina, V., Mazza, F., Todaro, M. 2013. Effects of diet on casein and fatty acid profiles of milk from goats differing in genotype for α S1-casein synthesis. *European Food Research and Technology*, 237:951-963.
- Bonanno, A., Di Grigoli, A., Vargetto, D., Tornambè, G., Di Miceli, G., Giambalvo, D. 2007. Grazing sulla and/or ryegrass forage for 8 or 24 hours daily. Effects on ewes feeding behaviour. In: Permanent and temporary grassland plant, environment and economy. De Vlieghe, A., Carlier, L. (Eds.), pp 208-211. European Grassland Federation. Ghent, Belgium.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., Mele, M. 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an in vitro study. *Animal*, 5:1521-1530.
- Cabiddu, A., Molle, G., Decandia, M., Spada, S., Fiori, M., Piredda, G., Addis, M. 2009. Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep. Part 2: Effects on milk fatty acid profile. *Livestock Science*, 123:230-240.
- Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P. 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate in vitro ruminal biohydrogenation in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 202:45-51.

- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F.J. 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 79:279-288.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:828-855.
- Copani, G., Ginane, C., Le Morvan, A., Niderkorn, V. 2014. Bioactive forage legumes as a strategy to improve silage quality and minimise nitrogenous losses. *Animal Production Science*, 54:1826-1829.
- Delgado, I., Andrés, C., Sin, E., Ochoa, J. 2004. La esparceta o pipirigallo, un cultivo a potenciar. *Surcos de Aragón*, 90:30-35.
- Doce, R.R. 2010. Consumo de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) por el ganado vacuno: aspectos nutricionales e intoxicación. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- Doce, R.R., Hervás, G., Belenguer, A., Toral, P.G., Giráldez, F.J., Frutos, P. 2009. Effect of the administration of young oak (*Quercus pyrenaica*) leaves to cattle on ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 150:75-85.
- Doreau, M., Ferlay, A. 1994. Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45:379-396.
- Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J.M., Stefanov, I., Vlaeminck, B. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function - An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172:51-65.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2004a. An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55:1125-1132.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2004b. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2:191-202.
- Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*, 95:215-226.
- Frutos, P.; Toral, P.G.; Lavín, P.; Hervás, G. and Mantecón, A.R. Feeding strategies to obtain high quality milk in intensive dairy sheep production systems. *Options Méditerranéennes A* (enviado).
- Gargouri, A., Caja, G., Casals, R., Mezghani, I. 2006. Lactational evaluation of effects of calcium soap of fatty acids on dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 66:1-10.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition*, 84:73-83.
- Girard, M., Dohme-Meier, F., Silacci, P., Ampuero Kragten, S., Kreuzer, M., Bee, G. 2015. Forage legumes rich in condensed tannins may increase n-3 fatty acid levels and sensory quality of lamb meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (en prensa).
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y. 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 91:4687-4703.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A.R., Juárez, M., de la Fuente, M.A., Hervás, G. 2008. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *Journal of Dairy Science*, 91:1560-1569.
- Harvatine, K.J., Boisclair, Y.R., Bauman, D.E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3:40-54.

- Hayot Carbonero, C., Mueller-Harvey, I., Brown, T.A., Smith, L. 2011. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. *Plant Genetic Resources*, 9:70-85.
- Hervás, G. 2001. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas: efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Álvarez del Pino, M.C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109:65-78.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mora, M.J., Fernández, B., Mantecón, A.R. 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124:107-118.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecón, A.R., Castañares, N., de la Fuente, M.A., Juárez, M., Frutos, P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 75:399-405.
- INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, Versailles, France.
- ISO 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 5983-2:2009. Animal feeding stuffs— Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content—Part 2: Block digestion and steam distillation method. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 5984:2002. Animal feeding stuffs—Determination of crude ash. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- ISO 6496:1999. Animal feeding stuffs—Determination of moisture and other volatile matter content. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid-metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76:3851-3863.
- Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86:397-412.
- Khiaosa-Ard, R., Bryner, S.F., Scheeder, M.R.L., Wettstein, H.R., Leiber, F., Kreuzer, M., Soliva, C.R. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*, 92:177-188.
- Lobón, S., Molino, F., Legua, M.A., Esevenri P., Cespedes M.A., Joy M. 2015. Efecto del forraje y de la inclusión de concentrado en la dieta sobre la producción de gas y metano en ovino. Pastos y forrajes en el siglo XXI. 54ª Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (S.E.E.P.): Palma (Mallorca), 14 al 17 de abril de 2015, pp. 243-250.
- Lock, A.L., Bauman D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39:1197-1206.
- Lock, A.L., Destailats, F., Kraft, J., German, J.B. 2008. Introduction to the Proceedings of the Symposium "Scientific update on dairy fats and cardiovascular diseases". *Journal of American College of Nutrition*, 27:720S-722S.
- Makkar, H.P.S. 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49:241-256.
- Makkar, H.P.S. 2003b. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A., Cheng, K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*, 72:3004-3018.

- McLeod, M.N. 1974. Plant tannins. Their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*, 44:803-815.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., Cheng, K.-J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 80:469-485.
- McSweeney, C.S., Makkar, H.P.S., Reed, J.D. 2003. Modification of rumen fermentation to reduce adverse effects of phytochemicals. Proceedings of the VI International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, pp. 239-268.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., Secchiari, P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Animal Research*, 55:273-285.
- Molle, G., Decandia, M., Foies, N., Ligios, S., Cabiddu, A., Sitzia, M. 2003. The performance of Mediterranean dairy sheep given access to sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) pastures in different time proportions. *Small Ruminant Research*, 49:319-328.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:2010-2037.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B. 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: Advances in plant cell biochemistry and biotechnology. Vol. 1. I.M. Morrison (Ed.), pp. 151-217. JAI Press Ltd., London, United Kingdom.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. In: World Health Organization Technical Reports Series. Vol. 916. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Palmquist, D.L., Lock, A.L., Shingfield, K.J., Bauman, D.E. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: Advances in Food and Nutrition Research, Taylor, S.L. (Ed.), pp. 179-217. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Priolo, A., Bella, M., Lanza, M., Galofaro, V., Biondi, L., Barbagallo, D., Salem, H.B., Pennisi, P. 2005. Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrate. *Small Ruminant Research*, 59:281-288.
- Pulina, G., Nudda, A., Battaccone, G., Cannas, A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology*, 131:255-291.
- Reardon, J., Foreman, J.A., Searcy, R.L. 1966. New reactants for colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta*, 14:403-405.
- Rodríguez, R., Britos, A., Rodríguez-Romero, N., Fondevila, M. 2011. Effect of plant extracts from several tanniferous browse legumes on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. *Animal Feed Science and Technology*, 168:188-195.
- Romero-Pérez, G.A., Ominski, K.H., McAllister, T.A., Krause, D.O. 2011. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:258-268.
- Roy, N.C., Knight, T.W., Reynolds, G.W., Deighton, M.H., Death, A.F., Sinclair, B.R., Peters, J.S., McNabb, W.C. 2002. The effect of condensed-tannins in fresh Sulla (*Hedysarum coronarium*) on the net flux of fatty acids across the mammary gland and their secretion in the milk of lactating ewes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 62:231-235.
- Shingfield, K.J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Äröla, A., Nurmela, K.V.V., Huhtanen, P., Griinari, J.M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77:165-179.

- Shingfield, K.J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Griinari, J.M. 2008a. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 99:971-983.
- Shingfield, K.J., Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4:1140-1166.
- Shingfield, K.J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., Givens, D.I. 2008b. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606:3-65.
- Silanikove, N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research*, 35:181-193.
- Smith, A.H., Zoetendal, E., Mackie, R.I. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50:197-205.
- Sukhija, P.S., Palmquist, D.L. 1988. Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36:1202-1206.
- Tava, A., De Benedetto, M.G., Tedesco, D., Di Miceli, G., Piluzza, G. 2005. Proanthocyanidins from *Hedysarum*, *Lotus*, *Onobrychis* spp. growing in Sardinia and Sicily and their antioxidant activity. *Proceedings of the XX International Grassland Congress*, offered papers book, p. 511 (abs).
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchase, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N. 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *Journal of Agricultural Science*, 119:265-273.
- Tiemann, T.T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C.E., Kreuzer, M., Hess, H.D. 2008. In vitro ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 146:222-241.
- Toral, P.G., Belenguer, A., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V., Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 95:794-806.
- Toral, P.G., Frutos, P., Hervás, G. 2009. Leche de oveja con más CLAse. Suplementación de la dieta de ovejas lecheras con distintas fuentes lipídicas. *Ganadería*, 62:46-51.
- Toral, P.G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A. 2010a. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 93:1604-1615.
- Toral, P.G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E., Frutos, P. 2013. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 96:431-439.
- Toral, P.G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, A., Frutos, P. 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*, 164:199-206.
- Toral, P.G., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V., Frutos, P. 2010b. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93:4804-4817.
- Turner, S.-A., Waghorn, G.C., Woodhard, S.L., Thomson, N.A. 2005. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) affect the detailed composition of milk from dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 65:283-289.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Second ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.

- Vasta, V., Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101:150-159.
- Vasta, V., Makkar, H.P.S., Mele, M., Priolo, A. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *British Journal of Nutrition*, 102:82-92.
- Vasta, V., Yañez-Ruiz, D.R., Mele, M., Serra, A., Luciano, G., Lanza, M., Biondi, L., Priolo, A. 2010. Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:2549-2555.
- Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*, 57:115-126.
- Wang, Y., Douglas, G.B., Waghorn, G.C., Barry, T.N., Foote, A.G. 1996. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in dairy ewes. *Journal of Agricultural Science*, 127:353-362.
- Wąsowska, I., Maia, M.R.G., Niedźwiedzka, K.M., Czauderna, M., Ribeiro, J., Devillard, E., Shingfield, K.J., Wallace, R.J. 2006. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 95:1199-1211.