



Universidad
Zaragoza



TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Influencia del tipo de forraje y de la presencia de taninos condensados en la fermentación *in vitro* de las dietas de ovino en el área mediterránea.

Uso de biomarcadores para la trazabilidad del sistema de alimentación.

Memoria presentada por

Pablo José Rufino Moya

para optar al grado de Doctor en Producción Animal por la
Universidad de Zaragoza

Mayo de 2019



Dr. **MANUEL FONDEVILA CAMPS**, Catedrático de Universidad del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria,

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Influencia del tipo del forraje y de la presencia de taninos condensados en la fermentación in vitro de las dietas de ovino en el área mediterránea. Uso de biomarcadores para la trazabilidad del sistema de alimentación*”, elaborada por el Licenciado en Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos **PABLO JOSÉ RUFINO MOYA**, ha sido realizada en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) bajo la dirección de las Dras. Margalida Joy Torrens y Mireia Blanco Alibés, se ajusta al proyecto de Tesis aprobado el 20 de Enero de 2015 y cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que considero procedente su presentación.

Para que conste, firmo la presente en Zaragoza, 14 de mayo de 2019

Fdo. Manuel Fondevila Camps

D^a. **Margalida Joy Torrens**, Doctora en Veterinaria y D^a. **Mireia Blanco Alibés**, Doctora en Ingeniería Agrónoma, como Investigadoras de la Unidad de Producción y Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA),

INFORMAN

Que D. **Pablo José Rufino Moya**, licenciado en Veterinaria y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “**Influencia del tipo de forraje y de la presencia de taninos condensados en la fermentación *in vitro* de las dietas de ovino en el área mediterránea. Uso de biomarcadores para la trazabilidad del sistema de alimentación**”, que se corresponde con el proyecto de Tesis aprobado por la Comisión de Doctorado y que cumple los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que se autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal de Tesis correspondiente.

Lo hacemos constar como Directoras del trabajo en Zaragoza, a 20 de mayo de 2019.



Fdo: Margalida Joy Torrens



Fdo: Mireia Blanco Alibés

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA-Aragón), en el marco del siguiente proyecto de investigación:

"Efecto de compuestos fenólicos de la dieta sobre los parámetros productivos, reproductivos y de calidad de la canal y de la carne en la especie ovina" INIA-RTA2012-00080. Investigador principal: Margalida Joy Torrens. Resolución de 28 de junio de 2013, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, BOE del 12 de julio de 2013.

El doctorando ha disfrutado de un contrato Pre-Doctoral de formación de personal investigador en agroalimentación (FPI-INIA) en el tema: **"Compuestos fenólicos en la dieta de rumiantes: determinación e influencia sobre la nutrición"**, bajo el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. Resolución de 18 de marzo de 2015, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, BOE del 21 de abril de 2015.

A mis padres...

A mis abuelos...

Cuando a lo largo de estos casi cinco años de Tesis me preguntaba ¿cuándo estaré escribiendo los agradecimientos?, se despertaban en mí dos tipos de sentimientos o motivaciones. Por un lado, la escritura de este apartado significa que está cerca el final y que se cierra una etapa, es una manera de sentir que he sido capaz y he alcanzado el objetivo. De manera que, aparte de los conocimientos científicos y profesionales, me quedo con el espíritu de superación que he ido adquiriendo en esta etapa de mi vida. Por otro lado, detrás de esta Tesis son muchas las personas que han colaborado y me han apoyado, tanto laboral como personalmente, y sin ellos hubiera sido imposible llevarla a cabo. Por eso, cada vez que recibía esa ayuda o cariño pasaba por mi mente el pensamiento de “acuérdate de ponerlo en los agradecimientos”, y cómo es posible que se me pase alguien, agradezco a todas aquellas personas que han compartido conmigo este viaje y que de una manera u otra me han facilitado poder llegar hasta aquí.

A mis directoras, Marga y Mireia, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por confiar en mí para “cacharrear” con los aparatos del laboratorio y por enseñarme todo lo que sé en el ámbito de la investigación. Agradezco especialmente el esfuerzo y la dedicación de este último tramo para poder llegar a la fecha que nos habíamos propuesto en medio de experimentos, organización de las jornadas AIDA y oposiciones.

A los profesores del programa de doctorado de Producción Animal de la Universidad de Zaragoza, por sus aportaciones y apuntes en las jornadas de seguimiento para tratar de mejorar los ensayos y la Tesis. Agradezco especialmente al doctor Manuel Fondevila por su labor como tutor académico y a la doctora Marimar Campo como coordinadora del programa.

A todos los compañeros de la Casa Amarilla, por los ratos de desayuno o comida y por su ayuda en cualquier ámbito que les haya planteado, desde estadística hasta recomendaciones gastronómicas. A Pedro, por su humor y complicidad para poder gastar bromas. A todos los compañeros del I+D, por dejarme usar sus equipos cuando lo he necesitado y por las amenas comidas del departamento, que permitían que pudiéramos conocernos mejor.

A todos los laborales del CITA, tanto de Zaragoza como de “La Garcipollera”, por su ayuda en las labores de campo y cuidado de los animales. A todos los trabajadores de personal, informática, administración, mantenimiento y seguridad del CITA, por su labor para agilizar trámites o resolver imprevistos. A Conchita, porque además de

tenernos todo superlimpio y hacer unas tortillas “que quitan el sentío”, es un gran ejemplo de humildad.

A los doctores Dani Villalba y Javi Álvarez de la Universidad de Lleida, por su ayuda con los análisis estadísticos y en la resolución de dudas o problemas que van surgiendo en el desarrollo de la Tesis. Al doctor Gonzalo Hervás del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC), por estar siempre dispuesto a resolverme dudas sobre el controvertido mundo de los taninos condensados. Al doctor Manolo Romero de Uniproca, por su amistad y ayuda para entender algunos conceptos de la fermentación *in vitro*.

A la doctora Jara Pérez, por permitirme hacer una estancia en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) de Madrid y enseñarme todo lo necesario para el estudio de los metabolitos en el músculo con dedicación y entusiasmo. A Isabel y Marisa, por su ofrecermme su experiencia y ayuda en el laboratorio.

A todo el personal del Instituto de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) de Granada, porque volver a allí es como volver a casa. Agradezco especialmente a los doctores David Yáñez, Ignacio Martín y Cristina Delgado por permitirme ir de estancia y poder mejorar mis conocimientos en diferentes técnicas de laboratorio. A Rafa Hueso, por estar siempre dispuesto a resolverme cualquier duda o consulta sobre aparatos o técnicas.

A todo el personal del departamento de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de la Universidad de Catania (Italia), no solo por abrirme las puertas de su laboratorio sino también las de su casa. A los doctores Alessandro Priolo, Giuseppe Luciano y Bernardo Valenti por darme la oportunidad de trabajar en vuestro equipo y aprender a vuestro lado. A Andrea Criscione, por las noches de billar y de *Champions*, ahora soy un *tifoso* más de la *vecchia signora*. Al resto de compañeros, Massimiliano Lanza, Salvatore Bordonaro, Marco Bella y Adriana Campione, por vuestro cariño y amabilidad desde que llegué.

A todo el equipo del Laboratorio de Digestibilidad del CITA, por los ratos de trabajo y por los de “taberna”. A Angelines, por sus consejos, por su importante ayuda en todos los experimentos y por ser un ejemplo de sabiduría empírica. A Guillermo Tanco, Pilar, Miguel Ángel y Adrián, por el cuidado de los animales canulados y la ayuda en todos los ensayos de esta Tesis. A Andrés, por ser un profesional meticuloso y por “quitarse el filtro” de vez en cuando.

A todos los becarios-precarios que han pasado por la sala maldita, dice la leyenda que una vez que perteneces a ella pillas alguna enfermedad, digamos que es una especie de bautizo. En primer lugar, agradecer el recibimiento de las “viejas glorias”. A Sandra, por su ayuda desde el primer día que llegué. A José Antonio, por sus charlas en el bus y las mañanas de Sanfermines. A Tamara, por su asistencia informática y alguna que otra divagación. A Laura y Carolina, por los ratos compartidos en las quedadas para cenar. En segundo lugar, agradecer el poder compartir un periodo de esta Tesis con gente que nos ha visitado para hacer estancias o trabajos fin de master. A Georgia, a Viviane, a Rebeca, a Álvaro y a Sergio, porque es gratificante y enriquecedor poder compartir experiencias desde otra cultura y desde otra perspectiva. En tercer lugar, agradecer la llegada de “savía nueva”, por transmitirnos la ilusión del principio y envejecernos o rejuvenecemos, según se mire. A Enrique y Karina, porque son “los que viven”. A Kenza, por sus dotes culinarios. A Claudia “ricicos”, por su espontaneidad, entusiasmo y descaro.

Mención aparte merecen las “tres patas del banco”. A Juanra, por ser un profesional enorme, porque gran parte de los resultados de esta Tesis tienen tu trabajo detrás y por poder contar contigo cada vez que lo he necesitado. A Agustí, por su calma, su escucha y por tener siempre algo para devolverme, permitiéndome ver las cosas de otra forma. A Alejandro, porque cualquier “Quijote” querría a un fiel escudero como tú, por tu amistad y por ser buena gente. Vosotros sabéis que si no hubiera sido por los “cuatro ratos” que hemos pasado juntos quizás no estaría escribiendo estas líneas.

A Toño y a Ana, porque desde que llegué a Zaragoza me habéis hecho sentir como parte de vuestra familia, y cuando se está lejos de casa esto cobra un sentido especial.

A los compañeros y profesores de TCI, por despertarme, por su escucha sin juicio y por su cariño. Especialmente a “*la Piña*”: Paloma, Maeni, Miriam y Ale, porque con vosotros además de *estar*, se puede *ser*.

A los “Manis”, este grupo de compañeros de promoción que tras el paso de los años podemos presumir de la misma unión y amistad, demostrando que lo se crea con fuertes cimientos (peas, vivencias, batallitas y muchas risas) perdura en el tiempo. Especialmente, a Cemi, José Daniel, Antonio Arenas, Nene, Alberto, Graci, Oxxo y “el Niño” que siempre han estado al pie del cañón tanto para una birra como para un favor.

A mis amigos de toda la vida, los “Putotes y Genios”, porque en los tiempos que corren es un privilegio y un regalo que sigamos unidos. El secreto está en esa frase de una canción de Amaral que dice: “son mis amigos, por encima de todas las cosas”. Gracias

por vuestro apoyo y vuestro cariño a pesar de que el contacto sea muy vez en cuando, es ahí donde reside la verdadera amistad. Agradezco especialmente a Edu, Chema, Bicho, Manue, Nina, Elisa, Angi y Luisa, porque con vuestra visita me habéis traído un trozo de Sur y eso se agradece.

A Irene, por creer en mí desde el primer momento en el que me dieron el contrato, dar el salto fue más fácil con tu apoyo. Por todo tu cariño, aprendizaje y camino compartido. Al final sí que va a ser cierto eso de que “todos los días sale el sol, chipirón”.

A toda mi familia, por su apoyo no en estos años de Tesis sino durante toda mi vida. A mis tíos y a mis primos, porque siempre tienen un gesto de cariño conmigo. En especial a mi prima Nuria, por sus visitas a Zaragoza y Catania. A Rica y a Virginia que, aunque no hayan subido a verme han sabido compensarlo dándome un regalo inigualable, mi sobrina Elena. A mis abuelos, que siempre me acompañan. Ellos tienen parte de culpa de que hoy sea lo que soy, gracias por enseñarme los valores y la humildad de la gente del campo, pero sobre todo por vuestro cariño, nada se puede comparar al amor de los abuelos. A mis padres, por el sacrificio y dedicación para que pudiera realizar mis estudios, por vuestro cariño, a veces en forma de ricas viandas... y porque sé que vosotros habéis hecho una “Tesis” paralela para coger un AVE o un avión para venir a verme.

“Procura que el niño que fuiste nunca se avergüence del adulto en el que te has convertido.”

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

“En medio del odio descubrí que había dentro de mí un amor invencible.
En medio de las lágrimas descubrí que había dentro de mí una sonrisa invencible.
En medio del caos descubrí que había dentro de mí una calma invencible.
Me di cuenta, a pesar de todo, que en medio del invierno había dentro de mí un verano invencible.

Y eso me hace feliz.

Porque no importa lo duro que el mundo empuje en mi contra, dentro de mi hay algo mejor empujando de vuelta.”

ALBERT CAMUS

Índices

Índice de Contenidos:

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Leguminosas forrajeras en el área mediterránea	3
1.1. Las leguminosas forrajeras objeto de interés en el estudio	4
1.1.1. Alfalfa.....	4
1.1.2. Esparceta.....	4
1.1.3. Zulla.....	5
1.2. Uso de leguminosas forrajeras en la alimentación de rumiantes.....	5
2. Compuestos secundarios en los forrajes.....	7
2.1. Características generales de los compuestos secundarios	7
2.2. Clasificación de los compuestos secundarios.....	8
2.2.1. Compuestos fenólicos.....	8
2.2.1.1. Flavonoides.....	8
2.2.1.2. No flavonoides.....	9
2.2.2. Terpenos	9
2.2.3. Compuestos secundarios nitrogenados y azufrados	10
2.3. Los compuestos secundarios en la alimentación de los rumiantes.....	10
3. Taninos condensados.....	11
3.1. Definición, estructura química y propiedades químicas.....	11
3.2. Determinación y cuantificación de los taninos condensados	13
3.3. Distribución y localización de los taninos condensados en las plantas.....	14
3.4. Factores que influyen en el contenido de taninos condensados de las leguminosas	15
3.5. Efecto de la inclusión de los taninos condensados en la dieta de los rumiantes	19
4. Efecto de los taninos condensados sobre la fermentación ruminal	23
4.1. Mecanismos de acción de los taninos condensados en el rumen	23
4.1.1. Privación del sustrato.....	23
4.1.2. Inhibición enzimática	23
4.1.3. Acción sobre los microorganismos ruminales.....	24
4.2. Parámetros de la fermentación <i>in vitro</i>	24
4.2.1. Degradabilidad de la materia seca (MS) o materia orgánica (MO).....	25
4.2.2. Producción de gas	27
4.2.3. Producción de metano	29
4.2.4. Contenido de amoníaco	31
4.2.5. Ácidos grasos volátiles	33
4.2.5.1. Producción total de ácidos grasos volátiles	34

4.2.5.2. Proporción de ácido acético (C ₂) y propiónico (C ₃).....	36
4.2.5.3. Proporción de ácido valérico, iso-butírico e iso-valérico.....	37
5. Carotenoides y tocoferoles	39
5.1. Características y propiedades de los carotenoides y las vitaminas liposolubles (A y E).....	40
5.1.1. Carotenoides y vitamina A	40
5.1.2. Tocoferoles y vitamina E.....	43
5.2. Contenido en carotenoides y tocoferoles en el alimento del ganado ovino.....	45
5.2.1. Forrajes	45
5.2.2. Piensos compuestos	46
5.3. Metabolismo de los carotenoides y tocoferoles en el ovino.....	46
5.3.1. Metabolismo ruminal y absorción.....	47
5.3.2. Transporte y depósito	49
5.4. Presencia de carotenoides y vitaminas liposolubles (A y E) en los fluidos y tejidos de los animales.....	50
5.4.1. Plasma.....	50
5.4.2. Leche	53
5.4.3. Hígado	54
5.4.4. Músculo	56
5.4.5. Tejido adiposo	58
5.5. Influencia de los taninos condensados sobre la concentración de las vitaminas liposolubles.....	59
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. Efecto de los taninos condensados sobre los parámetros de la fermentación <i>in vitro</i>	69
1.1. Animales donantes de inóculo ruminal.	69
1.2. Sustratos utilizados en los ensayos.....	69
1.2.1. Ensayo 1: Efecto en los parámetros de la fermentación <i>in vitro</i> de la inclusión de concentrado con y sin taninos condensados en forrajes de diferente calidad.....	69
1.2.2. Ensayo 2: Efecto en los parámetros de la fermentación <i>in vitro</i> de los taninos condensados de la esparceta en diferentes estados fenológicos frente al empleo de polietilenglicol (PEG) o en comparación con la alfalfa	70
1.2.3. Ensayo 3: Efecto del método de conservación en dos leguminosas ricas en taninos condensados sobre los parámetros de la fermentación <i>in vitro</i>	71
1.3. Técnica de fermentación <i>in vitro</i> : Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	71
1.4. Técnicas de laboratorio y análisis químicos.....	73
1.4.1. Análisis de la composición química	73

1.4.2. Análisis de polifenoles y taninos condensados.....	73
1.4.3. Determinación de la concentración de metano.....	75
1.4.4. Determinación de la concentración de amoníaco.....	75
1.4.5. Determinación de ácidos grasos volátiles.....	75
1.4.6. Determinación de la degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica.....	76
2. Efecto de la alimentación de la oveja en lactación sobre los contenidos en carotenoides y vitaminas liposolubles en el plasma y los tejidos del cordero.....	76
2.1. Animales, alimentos y diseño experimental.....	76
2.2. Toma de muestras.....	78
2.2.1. Alimentos.....	78
2.2.2. Plasma y tejidos del cordero.....	78
2.3. Análisis de carotenoides y vitaminas liposolubles.....	79
2.3.1. Extracción en las muestras de alimento.....	79
2.3.2. Extracción en las muestras de plasma y tejidos del cordero.....	79
2.3.3. Condiciones cromatográficas.....	80
3. Cálculos y análisis estadísticos.....	81
3.1. Cálculos.....	81
3.1.1. Cálculo de la producción de gas.....	81
3.1.2. Cinética de producción de gas en los sistemas de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.....	82
3.2. Análisis estadísticos.....	82
3.2.1. Composición química y contenidos en compuestos secundarios.....	82
3.2.2. Parámetros de la fermentación <i>in vitro</i>	82
3.2.3. Estudio de carotenoides y vitaminas liposolubles en suero y tejidos del cordero.....	83
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
CAPÍTULO 1: The inclusion of concentrate with quebracho is advisable in two forage-based diets of ewes according to the fermentation parameters.....	89
Simple summary.....	91
Abstract.....	91
1. Introduction.....	92
2. Material and methods.....	93
2.1. Experimental design.....	93
2.2. Animal and diets.....	93
2.2.1. Feedstuffs and substrates.....	93
2.2.2. Animals and sampling of ruminal digesta.....	94
2.2.3. <i>In vitro</i> gas production technique and sampling.....	94
2.3. Analytical methods.....	95

2.3.1. Chemical composition	95
2.3.2. Determination of the parameters of <i>in vitro</i> fermentation.....	96
2.3.3. Calculations and statistical analysis	97
3. Results.	97
3.1. Effect of the type of forage on <i>in vitro</i> fermentation.....	98
3.2. Hay-based diets: Effect of the inclusion of the control or quebracho concentrate.....	98
3.3. Fresh forage-based diet: Effect of the inclusion of control or quebracho concentrate.....	100
4. Discussion.....	101
4.1. Effects of the type of forage on fermentation parameters	101
4.2. Effect of the inclusion of concentrate with or without quebracho	102
5. Conclusions	104
CAPÍTULO 2: Methane production of fresh sainfoin, with or without PEG, and fresh alfalfa at different stages of maturity is similar but the fermentation end products vary	105
Simple summary	107
Abstract.....	107
1. Introduction	108
2. Material and methods	109
2.1. Experimental design	109
2.2. Animal and diets.....	109
2.2.1. Forages, crop management and harvest.....	109
2.2.2. Animals and sampling of ruminal digesta	110
2.2.3. <i>In vitro</i> gas production technique and sampling.....	110
2.3. Analytical methods	111
2.3.1. Chemical composition	111
2.3.2. Determination of parameters of the <i>in vitro</i> gas production technique	112
2.4. Statistical analyses.....	113
3. Results	113
3.1. Chemical composition	113
3.2. Contents of total polyphenols and condensed tannins.....	114
3.3. <i>In vitro</i> fermentation.....	116
4. Discussion.....	117
4.1. Effect of the substrate	119
4.2. Effect of the stage of maturity	122
5. Conclusions	124

CAPÍTULO 3: Effect of the method of preservation on the chemical composition and <i>in vitro</i> fermentation characteristics in two legumes rich in condensed tannins	125
Abstract.....	127
1. Introduction	127
2. Materials and methods.....	128
2.1. Animal and diets.....	128
2.1.1. Experimental design	128
2.1.2. Forages	129
2.1.3. Harvest and preservation of the forages	129
2.1.4. Animals and sampling of ruminal digesta	129
2.1.5. <i>In vitro</i> gas production technique and sampling.....	130
2.2. Analytical methods	131
2.2.1. Chemical composition	131
2.2.2. Determination of parameters of the <i>in vitro</i> gas production technique	132
2.3. Calculations and statistical analyses.....	133
3. Results	134
3.1. Sainfoin.....	134
3.2. Sulla	136
4. Discussion.....	139
4.1. Chemical composition and secondary compounds.....	139
4.2. Production of gas and methane as well as IVOMD.....	140
4.3. Fermentation end-products	140
5. Conclusions	142
CAPÍTULO 4: Effects of feeding system during lactation on the content of carotenoids and liposoluble vitamins in plasma and tissues of light lambs. Use of these compounds for traceability of feeding system	143
Abstract.....	145
1. Introduction	146
2. Material and methods	147
2.1. Animal management and experimental design.....	147
2.2. Measurements and sampling procedures.....	148
2.3. Carotenoids, retinol and tocopherol analyses	148
2.4. Calculations and statistical analyses.....	150
3. Results	150
3.1. Carotenoids and tocopherol in the feedstuffs	150
3.2. Plasma lutein, retinol and tocopherols concentrations	151
3.3. Lutein, retinol and tocopherols in the tissues of the lambs	153

3.4. Relationship between the concentration of the analytes in plasma and the content in the tissues of lambs	154
3.5. Discriminant analysis based on carotenoids and tocopherols	154
4. Discussion.....	158
4.1. Carotenoids and tocopherols in the feedstuffs.....	158
4.2. Carotenoids and retinol in the plasma and tissues of the lambs	158
4.3. Tocopherols in the plasma and tissues of the lambs.....	161
4.4. Discrimination analysis based on carotenoids and tocopherols	163
5. Conclusions	164
V. CONSIDERACIONES FINALES	167
1. Fermentación ruminal.....	169
1.1. Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica	170
1.2. Producción de gas y metano	171
1.3. Amoníaco	173
1.4. Ácidos grasos volátiles	174
2. Carotenoides y vitaminas liposolubles	177
3. Implicaciones.....	179
VI. CONCLUSIONES	181
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185
VIII. ANEXOS	225
Estancias realizadas	227
Participación en proyectos/convenios	233
Producción científica	237

Índice de Tablas

CAPÍTULO 1:

Table 1. Chemical composition of feedstuffs	97
Table 2. Effect of the type of forage and the inclusion of control or quebracho concentrate on gas and CH ₄ production, <i>in vitro</i> organic matter digestibility (IVOMD), NH ₃ -N, and volatile fatty acids (VFA) after 24 h of incubation	99

CAPÍTULO 2:

Table 1. Chemical composition and plant components of alfalfa and sainfoin at three stages of maturity	114
Table 2. Effect of the substrate (S) and the stage of maturity (SM) on gas and methane production (CH ₄), potential gas production (<i>A</i>), rate of gas production (<i>c</i>), <i>in vitro</i> organic matter degradability (IVOMD), ammonia (NH ₃ -N), and volatile fatty acids (VFA)...	118

CAPÍTULO 3:

Table 1. Effect of the preservation method on the chemical composition, polyphenols and condensed tannins (CT) of Sainfoin	134
Table 2. Effect of the preservation on the pH, production of gas and methane (CH ₄), the kinetics of fermentation, <i>in vitro</i> organic matter digestibility (IVOMD), ammonia (NH ₃ -N) and volatile fatty acids (VFA) after 72 h of incubation of Sainfoin.....	135
Table 3. Effect of preservation on chemical composition, polyphenols and condensed tannins (CT) of Sulla	137
Table 4. Effect of the preservation on the pH, production of gas and methane (CH ₄), the kinetics of fermentation, <i>in vitro</i> organic matter digestibility (IVOMD), ammonia (NH ₃ -N) and volatile fatty acids (VFA) after 72 h of incubation of Sulla.....	138

CAPÍTULO 4:

Table 1. Contents (mean ± standard error) of carotenoids and tocopherols in the feedstuffs	151
Table 2. Effect of the maternal feeding during lactation on the deposition of lutein, retinol and tocopherols in the tissues of the light lamb.....	153
Table 3. Percentages of correctly classified samples into the maternal feeding.....	155

Índice de Figuras:

INTRODUCCIÓN:

Figura 1. Principales estructuras poliméricas y monoméricas de las proantocianidinas..	12
Figura 2. Estructura química de los principales carotenoides	41
Figura 3. Estructura química de la vitamina A.....	42
Figura 4. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles	44

MATERIAL Y MÉTODOS:

Figura 1. Ingredientes y dietas utilizadas en el Ensayo 1	70
Figura 2. Distribución de los sustratos empleados en el Ensayo 2.....	70
Figura 3. Detalle de los sustratos empleados en el Ensayo 3	71
Figura 4. Diseño experimental del Ensayo 4.....	77

CAPÍTULO 1:

Figure 1. Fermentation kinetics of the hay-based diets during 24 hours of incubation.	100
Figure 2. Fermentation kinetics of the fresh forage-based diets during 24 hours of incubation	101

CAPÍTULO 2:

Figure 1. Effect of the species and the stage of maturity on the contents of total polyphenols (TP), total condensed tannins (TCT), extractable CT (ECT), protein-bound CT (PBCT), and fiber-bound (FBCT)	115
--	-----

CAPÍTULO 3:

Figure 1. Effect of the conservation method on the fermentation kinetics during incubation of Sainfoin	136
Figure 2. Effect of the conservation method on the fermentation kinetics during incubation of of Sulla	138

CAPÍTULO 4:

Figure 1. Effect of the maternal feeding on plasma retinol, α - and γ -tocopherol concentrations in the lamb.....	152
Figure 2. Canonical discriminant plots among maternal feedings in plasma at weaning and at slaughter.....	156
Figure 3. Canonical discriminant plots between maternal feeding in the carcasses of the light lambs using the analytes selected by the step-wise procedure.....	156

Figure 4. Canonical discriminant plots between maternal feeding in liver, muscle, perirenal and subcutaneous fat using the analytes determined in each tissue 157

Lista de abreviaturas

a.s.l: above sea level

A: producción potencial de gas

ADF_{om}: acid detergent fiber exclusive to residual ash

AGV: ácidos grasos volátiles

AGV_{total}: producción total de ácidos grasos volátiles

ANOVA: análisis de varianza (del inglés *analysis of variance*)

AVI: absolute value of the integral

BCVFA: branched-chain volatile fatty acid

BHT: butilhidroxitolueno

BW: body weight

c: velocidad de producción de gas

C₂: ácido acético

C₃: ácido propiónico

CH₄: metano

cm: centímetro

CNE: carbohidratos no estructurales

CP: crude protein

CT: condensed tannins

d.i: diámetro interno

d: día

DIVMO: degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica

DIVMS: degradabilidad *in vitro* de la materia seca

DM: dry matter

DMO: degradación de la materia orgánica

DMS: degradación de la materia seca

dOM: degraded organic matter

ECT: extractable condensed tannin

EE: extracto etéreo

End-F: end of flowering stage

FAD: fibra ácido detergente

FBCT: fiber-bound condensed tannin

FF: forraje fresco

FFC: 70% forraje fresco + 30% concentrado control

FFQ: 70% forraje fresco + 30% concentrado quebracho

FID: flame ionization detector

FM: fresh matter

FND: fibra neutro detergente

g (FRC): fuerza centrífuga relativa

g: gramo

GC: gas chromatograph

GLM: *generalized linear model*

H: heno

h: hora

ha: hectárea

HC: 70% heno + 30 % concentrado control

HDL: high density lipoprotein

HPLC-ESI-QTOF MS: High-Performance Liquid Chromatography coupled to Electrospray Ionization Quadropole Time-of-Flight Mass Spectrometry

HQ: 70% heno + 30% concentrado quebracho

i.d: internal diameter

ISO: International Organization for Standardization

IVOMD: *in vitro* organic matter degradability

J: julio

kg: kilogramo

kPa: kilopascal

L: litro

LAD: lignina ácido detergente

LDL: low density lipoprotein

Lignin (sa): lignin determined by solubilization of cellulose with sulfuric acid

m²: metro cuadrado

MALDI TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry

mg: miligramo

min: minuto

MJ: megajulio

mL: mililitro

mm: milímetro

mmol: milimol

MO: materia orgánica

MS: materia seca

n: número de muestras

ND: not detected

NDF_{om}: neutral detergent fiber exclusive to residual ash

ng: nanogramo

NH₃-N: amoníaco

nm: nanómetro

NSC: non-structural carbohydrates

p: peso

P: presión

P: probabilidad (nivel de significación)

p: producción de gas acumulada

PB: proteína bruta

PBCT: protein-bound condensed tannin

PC: procianidina

PD: prodefinidina

PEG: polietilenglicol

PSI: pounds-force per square inch

PV: peso vivo

r.s.d: residual standard deviation

r: Coeficiente de correlación

R: constante de los gases ideales

RMSE: Root mean standard error

rpm: revoluciones por minuto

s.e: standard error

s.e.m: standard error of the mean

Start-F: start of flowering stage

T: temperatura

t: tiempo de incubación

t: tonelada

TC: taninos condensados

TCF: taninos codensados ligado a fibra

TCL: taninos condensados libre

TCP: taninos condensados ligado a proteína

TCT: taninos condensados totales

TMR: total mixed ration

TP: total polyphenols

UPLC-MS/MS: Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer

v: volumen

VEG: vegetative stage

VFA: volatile fatty acid

VLDL: very low density lipoprotein

vs: versus

w: weight

α: alfa

β: beta

γ: gamma

δ: delta

λ_{emi}: longitud de onda de emisión

λ_{exc}: longitud de onda de excitación

μg: microgramo

μL: microlitro

μm: micrómetro

°C: grado Celsius

°K: grado Kelvin

Resumen / Summary

En la última década se ha promovido la reintroducción del pastoreo en el ovino como forma de explotación rentable y sostenible, fomentándose el uso de las leguminosas por sus beneficiosos efectos desde el punto de vista productivo y medioambiental. Además, los productos procedentes de animales alimentados en régimen extensivo son considerados más saludables. En la región mediterránea, el ovino puede aprovechar praderas polifitas en zonas de montaña y leguminosas plurianuales, como la alfalfa (*Medicago sativa*), la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) o la zulla (*Hedysarum coronarium*) en áreas cultivables, presentando estas dos últimas un contenido medio-alto de taninos condensados (TC). Dichos compuestos pueden afectar beneficiosamente a la fermentación ruminal, por lo que pueden ser incorporados a la dieta bien a partir de leguminosas forrajeras o mediante aditivos como el quebracho (*Schinopsis balansae*) en el concentrado. Además, los forrajes frescos usados en los sistemas extensivos contienen un alto contenido en carotenoides y tocoferoles que pueden reflejarse en el plasma o los tejidos de los animales que los consumen.

En la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo dos bloques de experimentos. Por un lado, se realizaron ensayos para valorar cómo las características de las dietas mediterráneas afectaban a la fermentación ruminal en ovino. Por otro lado, se realizó un ensayo *in vivo* para estudiar los carotenoides y vitaminas liposolubles en el plasma y los tejidos del cordero según el sistema de alimentación de la oveja durante la lactación y evaluar el uso de estos compuestos como herramienta de trazabilidad.

Los experimentos de la fermentación *in vitro* se realizaron con el sistema de producción de gas Ankom® con registro horario de la presión de cada botella. Se calculó la producción total de gas y se estimó la cinética de fermentación. Una vez finalizada la incubación se tomaron muestras para analizar la producción de metano (CH₄), el amoníaco (NH₃-N) y los ácidos grasos volátiles (AGV). Además, el contenido restante de cada botella se usó para estimar la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO).

El objetivo del primer ensayo fue estudiar los parámetros de la fermentación *in vitro* comparando: i) dietas basadas en heno vs. dietas basadas en forraje fresco y ii) la inclusión de 30% de concentrado control o con taninos condensados de quebracho en dietas de heno y forraje fresco. Las dietas de forraje fresco produjeron menos gas y proporción de propiónico y presentaron mayor DIVMO, contenido de NH₃-N y

proporción de valérico, iso-valérico e iso-butírico que las dietas a base heno. En las dietas constituidas por heno, la inclusión de ambos concentrados incrementó la ratio $C_2:C_3$. La inclusión de concentrado con quebracho aumentó DIVMO. En las dietas de forraje fresco, la inclusión del concentrado de control no afectó a la DIVMO ni al contenido en NH_3-N , mientras que la inclusión del concentrado con quebracho incrementó la DIVMO y redujo el contenido de NH_3-N . La inclusión de concentrado con quebracho redujo la proporción de valérico, mientras que la inclusión de ambos redujo la proporción de iso-butírico e iso-valérico, siendo en mayor grado con la incorporación de concentrado con quebracho. En conclusión, sería más recomendable la inclusión de concentrado con quebracho que de concentrado control en la dieta de las ovejas en producción para aumentar la eficiencia en las dietas de heno y proteger la proteína de degradación en las dietas de forraje fresco.

El objetivo del segundo ensayo fue clarificar si las diferencias entre la alfalfa y la esparceta se debían a la composición química o a la presencia de TC, usándose el polietilenglicol (PEG) como bloqueante de los TC. Ni el sustrato ni el estado fenológico afectaron a la producción de gas y CH_4 . La esparceta tuvo mayor DIVMO que la alfalfa independientemente de la adición de PEG. El sustrato afectó al contenido en NH_3-N , mostrando la esparceta un menor contenido que la alfalfa y la esparceta+PEG. La producción total de AGV únicamente se vio afectada por el estado fenológico, presentando el inicio de la floración la mayor producción. La alfalfa produjo una menor proporción de acético y mayor del resto AGV que la esparceta, independientemente de la inclusión de PEG. La inclusión de PEG incrementó la proporción de acético y redujo la proporción del resto de AGV. El estado fenológico también afectó a estas proporciones, presentando el estado vegetativo la menor proporción de acético y la mayor de propionico, iso-butírico e iso-valérico. La ratio $C_2:C_3$ fue más alto en la esparceta, seguido de la esparceta+PEG y más bajo en la alfalfa, y en relación al estado fenológico, dicha ratio que fue más baja en el estado vegetativo que en el resto de estados estudiados. A la vista de los resultados, la esparceta podría ser una buena alternativa a la alfalfa debido a su alta degradabilidad y a la protección de la degradación ruminal de la proteína que ejercen sus TC. El estado fenológico tuvo poca influencia sobre los parámetros de la fermentación *in vitro* debido a que las diferencias entre los distintos estados fueron pequeñas.

El objetivo del tercer ensayo fue evaluar el efecto del método de conservación sobre los parámetros de la fermentación *in vitro* respecto al forraje fresco en esparceta y

zulla. En la esparceta, el silo presentó la menor producción de gas y CH₄ que el forraje fresco y el heno, que presentaron similar producción de CH₄. El forraje fresco y el silo presentaron mayor DIVMO que el heno. La conservación no afectó al contenido de NH₃-N ni a producción total de AGV. El forraje fresco y el heno tuvieron mayor ratio C₂:C₃ que el silo. El forraje fresco produjo menor proporción de los iso-ácidos que el forraje conservado. En la zulla, el forraje fresco presentó mayor producción de gas y CH₄ que la zulla conservada, presentado el heno mayores producciones que el silo. El forraje fresco tuvo mayor DIVMO que el silo y el heno, presentando este último la menor DIVMO. La zulla fresca y el heno presentaron mayor producción total de AGV y mayor proporción de acético que el silo. El forraje fresco presentó la ratio C₂:C₃ más baja, seguida del heno y siendo más alta en el silo. El silo presentó mayor proporción de butírico, valérico e iso-ácidos que el forraje fresco y el heno, los cuales fueron diferentes entre ellos. Se puede concluir que el método de conservación influyó de manera diferente en los parámetros de la fermentación *in vitro*, resultando más aconsejable la conservación mediante silo que mediante heno en ambas leguminosas forrajeras.

El objetivo del cuarto ensayo fue: i) evaluar el efecto del sistema de alimentación (intensivo, pastoreo en alfalfa y pastoreo en esparceta) durante la lactación sobre el contenido de carotenoides y vitaminas liposolubles (A y E) en el plasma y los tejidos del cordero tras un periodo de cebo; ii) validar el uso de estos analitos como herramienta para trazar la alimentación de recibida. Para ello se utilizaron 31 parejas de oveja-cordero que se distribuyeron durante la lactación en tres sistemas de alimentación. Una vez destetados, los corderos se alimentaron con pienso hasta que alcanzaron un peso vivo de 22-24 kg. Tras el sacrificio se tomaron muestras del hígado, del músculo *longissimus dorsi* y de la grasa perirenal y subcutánea. Además, se tomaron muestras de plasma al inicio de la lactación, al destete y al sacrificio. Los carotenoides, retinol y tocoferoles se determinaron sobre los alimentos ofrecidos a los animales y en las muestras biológicas anteriormente descritas mediante cromatografía en UPLC. La concentración de luteína, α - y γ -tocoferol del plasma de los corderos al destete reflejó el contenido de los alimentos recibidos durante la lactación. Sin embargo, la mayoría de las diferencias desaparecieron en el plasma obtenido al sacrificio. Los corderos de esparceta mostraron mayor retinol en el hígado y mayor α -tocoferol en el músculo que los corderos de alfalfa y los de intensivo. En los depósitos grasos, los corderos de alfalfa y esparceta presentaron mayor contenido en retinol y α -tocoferol que los de intensivo. Los corderos de esparceta presentaron mayor

retinol en la grasa subcutánea y α -tocoferol en ambos depósitos que los de alfalfa. La concentración de los analitos en el plasma al destete discriminó correctamente el 100% de las muestras entre intensivo y pastoreo (alfalfa y esparceta), pero no es capaz de discriminar correctamente entre leguminosas. La clasificación de las canales y los tejidos no fue lo suficientemente precisa y es necesario buscar otros analitos. Los resultados obtenidos recalcan la influencia de la alimentación en la lactación de los corderos, siendo recomendable el pastoreo de leguminosas, especialmente cuando dicho pastoreo se hace en esparceta.

In the last decade, grazing has been promoted in Mediterranean areas as a profitable and sustainable production system, encouraging the use of leguminous forages because of their productive and environmental beneficial effects. In addition, products from grazing animals are considered healthier. In the Mediterranean region, sheep can graze on mountain meadows and in arable lands on pluriannual legumes such as alfalfa (*Medicago sativa*), sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) or sulla (*Hedysarum coronarium*), the latter two presenting a medium-high content of condensed tannins (CT). These compounds can beneficially affect ruminal fermentation, so they can be incorporated into the diet either from forage legumes or through additives such as quebracho (*Schinopsis balansae*) in the concentrate. In addition, fresh forages used in grazed systems contain a high content of carotenoids and tocopherols that can be reflected in the plasma or tissues of the animals that consume them.

In the present Thesis, three *in vitro* fermentation trials were carried out to compare the fermentation parameters according to different factors in diets fed to ovine under Mediterranean conditions. On the other hand, an *in vivo* trial was carried out to determine the effect of the feeding system of the dam during lactation on carotenoids and liposoluble vitamins in the plasma and tissues of the lamb and evaluate the use of these compounds as a traceability tool.

The Ankom® gas production system was used to evaluate the *in vitro* fermentation parameters. During the incubation, the pressure of each bottle was collected hourly. The total gas production was determined. At the end of incubation, samples were collected to determine the production of methane (CH₄), ammonia (NH₃-N) and volatile fatty acids (VFA). The remaining content of each bottle was used to estimate the *in vitro* organic matter (IVOMD).

The objective of the first trial was to compare the *in vitro* fermentation parameters of: i) hay- vs. fresh forage-diets forage ii) the inclusion of 30% concentrate with or without quebracho CT in each type of forage. Fresh forage-based diets showed lower gas production and proportion of propionic acid, whereas they had higher IVOMD, NH₃-N content and proportions of valeric, iso-valeric and iso-butyric acid than hay-based diets. In hay-based diets, the inclusion of both concentrates increased the ratio C₂:C₃. The inclusion of the quebracho increased the IVOMD. In fresh forage-based diets, the inclusion of control concentrate did not affect the IVOMD and the NH₃-N content. In

contrast, the inclusion of quebracho concentrate increased the IVOMD and reduced the content of $\text{NH}_3\text{-N}$. The inclusion of quebracho concentrate reduced the proportion of valeric acid, whereas the inclusion of both concentrates did not affect the $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio and reduced the proportion of iso-butyric and iso-valeric acid, although with a greater extent with the incorporation of quebracho concentrate. In conclusion, it would be more advisable to include concentrate with quebracho than control concentrate in the diet of lactating sheep to increase efficiency in hay diets and to protect the protein from degradation in fresh forage diets.

The aim of the second trial was to compare the *in vitro* fermentation parameters of alfalfa and sainfoin in different phenological stage and to clarify whether the differences between both legumes are due to the presence of the CTs, using a blocking agent of the TC, the polyethylene glycol (PEG). Neither the type of substrate nor the phenological stage affected gas and CH_4 production. Sainfoin had higher IVOMD than the alfalfa irrespectively of the PEG addition. The type of substrate affected the $\text{NH}_3\text{-N}$ content, showing sainfoin lower content than alfalfa and sainfoin+PEG. The total production of VFA was only affected by the phenological stage, showing the start-flowering stage the highest production. The substrate affected most of the individual VFA. Alfalfa produced lower proportion of acetic acid and higher proportion in the rest of VFA than the sainfoin, irrespectively the inclusion of PEG. The inclusion of PEG increased the acetic acid and reduced the proportion of the rest of the VFA. The phenological stage also affected these proportions, presenting the vegetative stage showing the lowest proportion of acetic and the highest proportion of propionic, iso-butyric and iso-valeric. The $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio was highest in the sainfoin, followed by the sainfoin+PEG and lower in the alfalfa. The $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio was lower at vegetative stage than in the other phenological stages. In view of the results, the sainfoin might be a good alternative to alfalfa due to its high degradability and the potential protection against ruminal protein degradation by its CT. The phenological stage had little influence on the parameters of *in vitro* fermentation because the differences were slight between the stages.

The objective of the third trial was evaluate the effect of the preservation method on the parameters of *in vitro* fermentation with respect to fresh forage using sainfoin and sulla. In sainfoin, silage presented the lowest production of gas and CH_4 than of fresh forage and hay, which presented similar production of CH_4 . Fresh forage and silage

presented higher IVOMD than hay. Preservation did not affect the $\text{NH}_3\text{-N}$ content or total VFA production. Fresh forage and hay had higher $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio for the silage. Fresh forage produced lower iso-acids than the preserved forages. In sulla, fresh forage showed higher gas and CH_4 production than the preserved forages, showing hay higher production than silage. Fresh forage had higher IVOMD than preserved forages, being in silage higher than hay. Fresh forage and hay showed higher total VFA production and higher acetic acid proportion than the silage. Fresh forage presented the lowest $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio, followed by hay and the highest ratio in silage. Silage presented greater proportion of butyric, valeric and iso-valeric than fresh forage and hay, which presented differences. It can be concluded that the preservation method influenced the parameters of *in vitro* fermentation differently, being more advisable the silage than hay in both forage legumes.

The aims of this fourth trial to evaluate: i) the effect of the maternal feeding on the contents of carotenoids and liposoluble vitamins in the plasma and in the tissues of the light lamb; ii) the use of these analytes as a tool to trace the feeding received. Thirty-one ewe-lamb pairs of the Rasa Aragonesa breed were distributed in three feeding systems during lactation (intensive, grazing in alfalfa and grazing in sainfoin). At weaning, the lambs started a commercial fattening phase until they reached a live weight of 22-24 kg. Subsequently, they were slaughtered and samples from the liver, the *longissimus dorsi* muscle and the perirenal and subcutaneous fat were collected. In addition, plasma samples were taken at the start of lactation, at weaning and at slaughter. Carotenoids, retinol and tocopherols were determined on the feedstuffs offered to the animals and in the plasma and tissues of lambs by chromatography on UPLC. At weaning, the concentration of lutein, α - and γ -tocopherol in the plasma of lambs mimicked the contents in the feedstuffs. However, most of the differences disappeared at slaughter. Sainfoin lambs had higher contents of retinol in the liver and α -tocopherol in the muscle than alfalfa and intensive lambs, which had the lowest contents. In both fat deposits, alfalfa and sainfoin lambs had higher retinol and α -tocopherol contents than intensive lambs. Sainfoin lambs showed greater retinol in subcutaneous fat and α -tocopherol in both deposits than alfalfa lambs. The concentration of analytes in plasma at weaning correctly classified 100% of the samples, but it was not possible to discriminate alfalfa and sainfoin lambs. The accuracy of the classification of the carcasses and tissues has to be improved. The obtained results emphasize the influence of the feeding in the lactation of the lambs, being advisable the grazing of legumes, especially in sainfoin.

I. Introducción

1. LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN EL ÁREA MEDITERRÁNEA.

En el área mediterránea, son comunes las leguminosas forrajeras plurianuales, como la alfalfa (*Medicago sativa*), la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) o la zulla (*Hedysarum coronarium*). Estas leguminosas prefieren climas mediterráneos subhúmedos, aunque se adaptan bien a climas semiáridos moderadamente cálidos y secos, siendo algunas especies compatibles con los climas de alta montaña. Se desarrollan mejor en suelos franco-arcillosos profundos, con un pH de neutro a básico. Requieren precipitaciones moderadas (400 a 800 mm anuales) o el riego en los meses más secos. El aprovechamiento y productividad de estos forrajes depende en gran parte de su capacidad de establecimiento y persistencia en las praderas (Molle *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2014; Phelan *et al.*, 2015).

El cultivo de las leguminosas aporta una serie de beneficios medioambientales, entre los cuales destaca la fijación de nitrógeno (N) atmosférico gracias a la presencia de bacterias del género *Rhizobium* o *Sinorhizobium* en su sistema radicular, tolerando el uso de fertilizantes sin N inorgánico (Chapagain y Riseman, 2015). Dicha característica permite reducir el laboreo, la erosión y la lixiviación de nitratos que producen eutrofización (Rochon *et al.*, 2004), así como disminuir las emisiones de CO₂ y N₂O ligadas a las labores fertilización y fabricación de los abonos nitrogenados (Williams *et al.*, 2006). Las leguminosas favorecen la biodiversidad de los ecosistemas (Phelan *et al.*, 2015) y permiten un buen aprovechamiento del agua y nutrientes presentes en las capas inferiores del suelo gracias a su profundo sistema radicular (Gonzalez-Hidalgo *et al.*, 2010). Además, la inclusión de leguminosas en las rotaciones de cultivos mejora la producción de las praderas, permite un mayor número de días en pastoreo y rompe los ciclos de las malas hierbas (Graham *et al.*, 2003; Rochon *et al.*, 2004).

El uso de las leguminosas forrajeras en la alimentación animal es interesante porque tienen un alto valor nutricional y presentan una elevada digestibilidad permitiendo un excelente rendimiento en la producción animal (Waghorn *et al.*, 1998; Aufrère *et al.*, 2008; Bonanno *et al.*, 2011). Además, los sistemas productivos basados en leguminosas generan menores emisiones de N₂O por hectárea (ha) y de metano (CH₄) por kg de materia seca (MS) ingerida o por kg de leche/carne producida cuando se comparan con gramíneas (Rochette y Janzen, 2005; Eggleston *et al.*, 2006; Waghorn y Clark, 2006). Por todo ello, la Unión Europea incorporó a la Política Agraria Común medidas de apoyo para el

desarrollo de sistemas de rotación de cultivos, incluyendo leguminosas y proteaginosas, encaminadas tanto a limitar la dependencia de las importaciones de materias primas ricas en proteína como para aprovechar sus beneficiosos efectos medioambientales (Real Decreto 1075/2014). Todo lo anteriormente expuesto ha incrementado el interés por la recuperación del cultivo de leguminosas forrajeras.

1.1. Las leguminosas forrajeras objeto de interés en el estudio.

La alfalfa es la leguminosa forrajera más cultivada en España (270.874 ha), siendo la extensión dedicada al cultivo de la esparceta menor (25.025 ha) y puntual en determinadas zonas para la zulla (423 ha). La producción de alfalfa supone el 84% de la producción total de leguminosas forrajeras, estando muy por debajo la esparceta (1,8%) y la zulla (0,06%) (MAGRAMA, 2017).

1.1.1. Alfalfa.

La alfalfa se cultiva principalmente en el valle del Ebro y en el valle del Duero (Benito *et al.*, 2000). Es una leguminosa forrajera con alto rendimiento (2,5-20 t MS/ha), dependiendo sus producciones del régimen pluviométrico, de las características texturales del suelo y de la longevidad de la pradera (Cook *et al.*, 2005; Frame y Laidlaw, 2005; Delgado *et al.*, 2014). En regadío, el cultivo de la alfalfa permite un aprovechamiento de 5-6 cortes cada 25-35 días. La alfalfa se emplea principalmente henificada, aunque también ensilada, deshidratada o consumida directamente en pastoreo (Frame y Laidlaw, 2005; Radović *et al.*, 2009). La alfalfa tiene un excelente valor nutritivo debido a su elevada digestibilidad y a su alto contenido en proteína bruta (PB) (220 g/kg MS) con un perfil de aminoácidos equilibrado para los rumiantes (Agabriel, 2010; Delgado *et al.*, 2014). El contenido medio en fibra neutro detergente (FND) es de 386 g/kg MS (Delgado *et al.*, 2014). La calidad puede variar debido al estado fenológico, el corte, la relación hoja:tallo y el método de conservación (Aufrère *et al.*, 2008; Theodoridou *et al.*, 2011a; Chung *et al.*, 2013).

1.1.2. Esparceta.

La esparceta se cultiva en zonas de altitud superiores a 600 m como sustituto de la alfalfa, fundamentalmente en áreas prepirenaicas y en el Sistema Ibérico (Valdés, 2000). La producción de la esparceta en Aragón varía de 2,5 a 11,5 t MS/ha dependiendo de las condiciones ambientales, la variedad y del estado fenológico (Delgado *et al.*, 2014).

La forma de aprovechamiento habitual es realizar una siega primaveral para heno, en plena floración, y un corte o pastoreo del rebrote en otoño o en invierno, aunque también se ensila (Cavallarín *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2008). La esparceta tiene una alta digestibilidad (Aufrère *et al.*, 2008; Theodoridou *et al.*, 2010). Su contenido en PB es elevado (hasta 200 g/kg MS) y su contenido medio en FND es de 450 g/kg MS (Delgado *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2014). La calidad de este forraje puede variar según la variedad, el estado fenológico y la conservación (Hatew *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Sheppard *et al.*, 2019). Una de las principales diferencias con la alfalfa es que la esparceta contiene taninos condensados (TC) en una concentración de 10-90 g/kg MS (Mueller-Harvey *et al.*, 2019).

1.1.3. Zulla.

La principal zona de cultivo y producción en España se encuentra en las Islas Baleares y Andalucía (MAGRAMA, 2017). Su producción en estas zonas alcanza las 7,2 t MS/ha en el primer año y 9 t MS/ha para el segundo año de cultivo (Bustamante *et al.*, 2000). El manejo de este cultivo depende de las condiciones edafoclimáticas y las necesidades de la explotación. De Koning *et al.* (2008) recomienda no realizar un corte durante el primer año para no comprometer las producciones futuras, mientras que Bustamante *et al.* (2000) recomienda hacer un único corte el primer año para ensilar. Se puede aprovechar de diferentes maneras, recomendándose el pastoreo previamente al establecimiento de las yemas florales (Foster, 2010). La henificación presenta buenos resultados mientras que el ensilado puede generar algunos problemas (Olives, 1967; Bustamante, 2005) que se pueden resolver combinando la zulla con alguna gramínea (Leto *et al.*, 2002). La zulla presenta una buena digestibilidad, una PB que oscila entre 140-240 g/kg MS y un contenido medio en FND de 368 g/kg MS (Molle *et al.*, 2003; Dentinho *et al.*, 2006; de Koning *et al.*, 2010). Su valor nutritivo varía según el estado fenológico y el método de conservación (Piccaglia *et al.*, 2003; Ben Jeddi, 2005; Dentinho *et al.*, 2006), y al igual que la esparceta, presenta un contenido moderado en TC que oscila entre 20-120 g/kg MS (Mueller-Harvey *et al.*, 2019).

1.2. **Uso de leguminosas forrajeras en la alimentación de rumiantes.**

El aprovechamiento mayoritario de estas leguminosas para la alimentación de rumiantes es mediante la conservación debido a la dependencia estacional y al rendimiento desigual a lo largo de su ciclo productivo, aunque también se aprovechan en

pastoreo con buenos resultados. Las leguminosas, en general, tienen menores tasas de crecimiento y de producción forrajera en las estaciones frías que en las cálidas (Frame *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2009). En este sentido, dos tercios de la producción anual de la esparceta y la zulla se da en primavera y el resto se distribuye entre el verano y el otoño (Pérez, 1994; Delgado *et al.*, 2008). Esto hace que sea necesario conservar parte de la producción para optimizar el aprovechamiento del forraje y satisfacer los requerimientos de la producción ganadera. La henificación es la forma de conservación comúnmente usada en leguminosas como la alfalfa, donde hay que tener un especial cuidado para evitar pérdidas de nutrientes, principalmente de PB, causadas por el manejo mecánico, la exposición a la intemperie o la respiración durante el almacenamiento (Rotz y Abrams, 1988). El ensilado es una forma de conservación más extendida en gramíneas, aunque también se utiliza en leguminosas (Wilkinson y Toivonen, 2003). El motivo de ello es que las leguminosas presentan un bajo contenido en carbohidratos solubles y una alta capacidad tampón que pueden impedir una correcta acidificación del ensilado (Heinritz *et al.*, 2012; King *et al.*, 2012). Sin embargo, esto se puede paliar con una efectiva marchitez previa al ensilaje y/o la aplicación de aditivos durante el proceso de ensilado que favorecen una fermentación adecuada (Pahlow *et al.*, 2001). La presencia de TC resulta ventajosa porque reduce la degradación de PB durante el proceso de ensilado (Niezen *et al.*, 1998; Copani *et al.*, 2016).

Numerosos estudios indican las ventajas del empleo de las leguminosas en base a la mejora de los rendimientos en los sistemas de producción de rumiantes (Rochon *et al.*, 2004; Steinshamn, 2010; Przemysław *et al.*, 2015; Johansen *et al.*, 2018). Dicha mejora en los rendimientos se debe a que las leguminosas contienen elevados niveles de PB con un alto valor biológico (Journet, 1993; Rochon *et al.*, 2004; Bues *et al.*, 2013). Además, los animales ingieren elevadas cantidades de leguminosas porque tienen una alta velocidad de tránsito por el rumen, favorecida por la rápida tasa de degradación y fermentación que presenta su porción fibrosa (Moseley y Jones, 1984; Waghorn *et al.*, 1989; Beever y Thorp, 1996; Peyraud *et al.*, 2009). La alta ingesta voluntaria de energía y proteína permite cubrir las necesidades y aumentar la productividad del ganado (Beever y Thorp, 1996; Dewhurst *et al.*, 2009; Kleen *et al.*, 2011).

Los rendimientos productivos del ovino pastando alfalfa o esparceta son similares a los rendimientos observados en ovino alimentado a base heno/paja más concentrado (Alvarez-Rodríguez *et al.*, 2010; Joy *et al.*, 2012; Lobón *et al.*, 2019b). El vacuno tiene

rendimientos similares o un poco inferiores cuando pasta alfalfa que cuando se alimenta con concentrado (Blanco *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2011). Sin embargo, el timpanismo espumoso es una de las limitaciones importantes para el consumo en fresco de algunas leguminosas como la alfalfa (Dewhurst *et al.*, 2009; Phelan *et al.*, 2015) que se asocia a la alta ingesta voluntaria, el alto contenido proteico y las tasas rápidas de degradación de partículas en el rumen (Clarke y Reid, 1974; Majak *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, un manejo adecuado del pastoreo reduce la incidencia del timpanismo (Rochon *et al.*, 2004). Además, las leguminosas que contienen TC, como la esparceta o la zulla, se caracterizan por un bajo riesgo para causar timpanismo (McMahon *et al.*, 2000; Patra y Saxena, 2011).

2. COMPUESTOS SECUNDARIOS EN LOS FORRAJES.

2.1. Características generales de los compuestos secundarios.

El metabolismo primario de las plantas engloba a aquellos procesos bioquímicos y metabólicos relacionados con el crecimiento, desarrollo y reproducción, que aparecen en el citoplasma de todas las células vegetales y cuyas diferencias entre especies son únicamente de índole cuantitativo (Ramos *et al.*, 1998). Mientras que el “*metabolismo secundario de las plantas*”, introducido por Albrecht Kossel en 1891, se refiere a una amplia gama de compuestos químicos que no están involucrados directamente en el metabolismo primario (Hartmann, 2007). En este sentido, se pueden considerar a los compuestos secundarios como *sustancias ecológicamente eficaces*, frente a los compuestos primarios que serían *sustancias fisiológicamente eficaces* (Strasburger *et al.*, 1994).

Los precursores de los compuestos secundarios derivan de moléculas del metabolismo primario como son el acetyl-CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico o 1-desoxilulosa 5-fosfato (Dewick, 2002; Giweli *et al.*, 2013). Los compuestos secundarios pueden encontrarse en los órganos de síntesis o distribuirse por diferentes tejidos según su importancia para el desarrollo de la planta y su estado fenológico (Price *et al.*, 1979; Makkar *et al.*, 1991; Kuśnierczyk *et al.*, 2007). En general, todas las partes en crecimiento como son las yemas, las hojas o los órganos reproductores, muestran una mayor concentración de estos compuestos que los restantes tejidos (Ramos *et al.*, 1998; Piluzza *et al.*, 2014). La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa, estando su biosíntesis vinculada a estímulos bióticos o abióticos (Acamovic y Brooker,

2005; Bodas *et al.*, 2012). La presencia de compuestos con acción tóxica o antinutritiva en las plantas puede reducir su digestibilidad y palatabilidad en los herbívoros que la consumen, disuadiendo su uso para la alimentación (Ramos *et al.*, 1998; Makkar, 2003a; Scharenberg *et al.*, 2007a; Patra y Saxena, 2010). También pueden actuar como agentes alelopáticos o protegiendo a la planta de radiaciones ultravioletas (Duke *et al.*, 2001; Valares Masa, 2011).

2.2. Clasificación de los compuestos secundarios.

Se han identificado más de 200.000 estructuras relacionadas con los compuestos secundarios de las plantas (Hartmann, 2007). Estos compuestos presentan rutas metabólicas de síntesis, propiedades y mecanismos de acción que a menudo se superponen, dificultando la clasificación de los mismos (Bodas *et al.*, 2012). Según su origen biosintético podrían dividirse en tres grupos principales: compuestos fenólicos, terpenos y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Crozier *et al.*, 2008; Goldberg, 2008). A continuación, se detallan en mayor profundidad los compuestos fenólicos y los terpenos por ser parte del objeto de esta Tesis.

2.2.1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos, que comúnmente se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. Proceden biosintéticamente de la ruta del shikimato/fenilpropanoide o la vía del acetato/malonato (Lattanzio, 2013). Se han identificado más de 8.000 estructuras fenólicas que están ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal (Strack, 1997). En base a su estructura, se pueden clasificar en dos grupos principales: los flavonoides y los no flavonoides.

2.2.1.1. Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con 15 carbonos, que se caracterizan por poseer estructuras C₆-C₃-C₆ y dos o más anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Para los flavonoides, este puente consta de tres carbonos que se combinan con un oxígeno y dos carbonos de uno de los anillos aromáticos (anillo A) para formar un tercer anillo de 6-miembros (anillo C). Las principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (Crozier *et al.*, 2008). El esqueleto flavonoide básico puede tener

numerosos sustituyentes, siendo muy comunes los glucósidos. Los flavonoides son solubles en agua cuando presentan azúcares y grupos hidroxilo, mientras que la presencia de grupos metilo y de unidades de isopentilos, hacen que los flavonoides sean lipófilos (Harborne, 2013). Dentro de este grupo se encuentran las proantocianidinas o TC que serán estudiados con más profundidad en el punto 3 de la presente Tesis.

2.2.1.2. No flavonoides.

Los principales no flavonoides son los ácidos fenólicos o hidroxibenzoatos (C_6-C_1), los hidroxicinamatos (C_6-C_3) y sus derivados conjugados, y los estilbenos polifenólicos ($C_6-C_2-C_6$). Dentro de los ácidos fenólicos cabe destacar el ácido gálico, componente principal de los galotaninos y elagitaninos, también conocidos como taninos hidrolizables que, a diferencia de los TC, se hidrolizan fácilmente con ácido diluido (Crozier *et al.*, 2008).

2.2.2. Terpenos.

Todos los terpenos o isoprenoides se forman mediante la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos basadas en el esqueleto de isopentano (C_5). El origen biosintético de estos compuestos es a partir de acetil-CoA o sus compuestos intermedios (Crozier *et al.*, 2008). Se han identificado más de 40.000 compuestos terpenoides estructuralmente diversos, formando la clase más amplia de metabolitos secundarios de las plantas (Bohlmann y Keeling, 2008).

Estos compuestos se clasifican por el número de unidades de isopreno presentes en la estructura principal. Los monoterpenos (C_{10}) son las moléculas más representativas, que constituyen el 90% de los aceites esenciales y consisten en varios tipos de compuestos con una gran variedad de grupos funcionales. Los sesquiterpenos (C_{15}) tienen una estructura y función similares a los monoterpenos y, en general, se engloban junto a ellos. Los diterpenos (C_{20}) son resinas de gimnospermas (por ejemplo, ácido abeítico) y compuestos tales como fitoles o tocoferoles (Cahoon *et al.*, 2003; Bodas *et al.*, 2012). Los triterpenos (C_{30}) destacan por ser compuestos biológicamente activos importantes como esteroides, saponinas triterpénicas o esteroideas y glucósidos cardiotónicos, resultantes de modificaciones esqueléticas de las cadenas laterales de los triterpenos (Tantillo, 2011). Los tetraterpenos (C_{40}) engloban a los carotenoides, que se dividen en carotenos si están compuestos únicamente por hidrocarburos, o en xantofilas si además de hidrógeno y

carbono contienen oxígeno (Nozière *et al.*, 2006; Kalač, 2012). Los politerpenos ($C_{>40}$) pueden estar libres o unidos a quinonas, siendo el caucho un ejemplo representativo de la complejidad estructural que pueden alcanzar estos compuestos, con hasta 6000 subunidades de isopreno repetidas (Ahmed *et al.*, 2017).

2.2.3. Compuestos secundarios nitrogenados y azufrados.

Los compuestos nitrogenados comprenden alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteicos. Mientras que los principales compuestos secundarios que contienen azufre son glucosinolatos (además contiene N), glutatión, aliinas, defensinas, tioninas y lectinas (Crozier *et al.*, 2008). Todos estos compuestos están relacionados con una acción defensiva frente al ataque de herbívoros o como respuesta al estrés biótico o abiótico a través de diferentes mecanismos (Hartmann, 1991; Seigler, 1991; Buchanan *et al.*, 2000; Mazid *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2017).

2.3. **Los compuestos secundarios en la alimentación de los rumiantes.**

Los compuestos secundarios han sido ignorados durante mucho tiempo en los trabajos de nutrición animal, a pesar de influir sobre algunos procesos metabólicos y fisiológicos de los animales (Ramos *et al.*, 1998). Actualmente, hay un gran interés en conocer y valorar la actividad biológica de estos compuestos sobre la nutrición y la producción animal (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005b; Rochfort *et al.*, 2008; Bodas *et al.*, 2012). Además, los compuestos secundarios pueden ser usados para mejorar la calidad de los productos animales (Vasta y Luciano, 2011), ya que compuestos como los TC, carotenoides o tocoferoles pueden mejorar la composición de los ácidos grasos de los productos y alargar la vida útil del producto debido a su capacidad antioxidante (Luciano *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014; Lobón *et al.*, 2017a; Luciano *et al.*, 2017).

Los metabolitos secundarios presentes en determinadas leguminosas forrajeras pueden producir efectos negativos o positivos en los animales dependiendo de su cantidad, concentración, procedencia y condiciones fisiológicas del animal, más allá del valor nutricional propio de la planta (Iason, 2005; Patra y Saxena, 2010). Entre los efectos negativos de los compuestos secundarios destacan: i) problemas de infertilidad en hembras debido a la presencia de los fitoestrógenos (Rochfort *et al.*, 2008; Phelan *et al.*, 2015); ii) efectos tóxicos en los animales por ingestión de glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, cumarinas, alcaloides y TC (Ramos *et al.*, 1998; Hervás *et al.*, 2003b); iii)

disminución de la ingesta, la digestibilidad y alteración la población de microorganismos ruminales debido a los TC, saponinas y terpenoides (Patra y Saxena, 2009; Patra y Saxena, 2010). En cuanto a los efectos positivos destacan: i) la reducción de la carga parasitaria por la presencia de TC, saponinas y terpenoides (Athanasiadou y Kyriazakis, 2004; Rochfort *et al.*, 2008); ii) la reducción de la producción de metano por parte de los rumiantes por la ingestión TC, saponinas y terpenoides (Patra y Saxena, 2010; Bodas *et al.*, 2012); iii) la prevención de la aparición de meteorismo debido a la presencia de TC (McMahon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012); y iv) mejora los rendimientos productivos debido a los efectos positivos que acabamos de describir (Rochfort *et al.*, 2008).

3. TANINOS CONDENSADOS.

3.1. Definición, estructura química y propiedades químicas.

Los taninos condensados o proantocianidinas son compuestos fenólicos oligoméricos o poliméricos no ramificados constituidos por monómeros de antocianinas (flavan-3-oles) unidas mediante enlaces carbono-carbono que no son susceptibles a la degradación anaeróbica de las enzimas (Schofield *et al.*, 2001; Haslam, 2007; Waghorn, 2008), pero se dividen en los cationes de sus monómeros (antocianidinas) tras el tratamiento con alcohol-ácido (Porter *et al.*, 1985). Todas las proantocianidinas contienen monómeros de (+) catequina y su isómero (-) epicatequina. Cuando están constituidas únicamente por estos monómeros se llaman procianidinas (PC), mientras que si además contienen (+) galocatequina y (-) epigalocatequina se denominan prodelfinidinas (PD) y cuando contienen (+) afzelequina y (-) epiafzelequina se denominan propelargonidinas (Rasmussen *et al.*, 2005; Jerónimo *et al.*, 2016). Cuando a estas proantocianidinas se les aplica un tratamiento alcohol-ácido se dividen en sus antocianidinas (cianidina, delfinidina o pelargonidina) (Crozier *et al.*, 2008). El polímero principal de los TC de la esparceta y la zulla son las prodelfinidinas, mientras que de la alfalfa son las procianidinas (Jonker y Yu, 2017; Mueller-Harvey *et al.*, 2019).

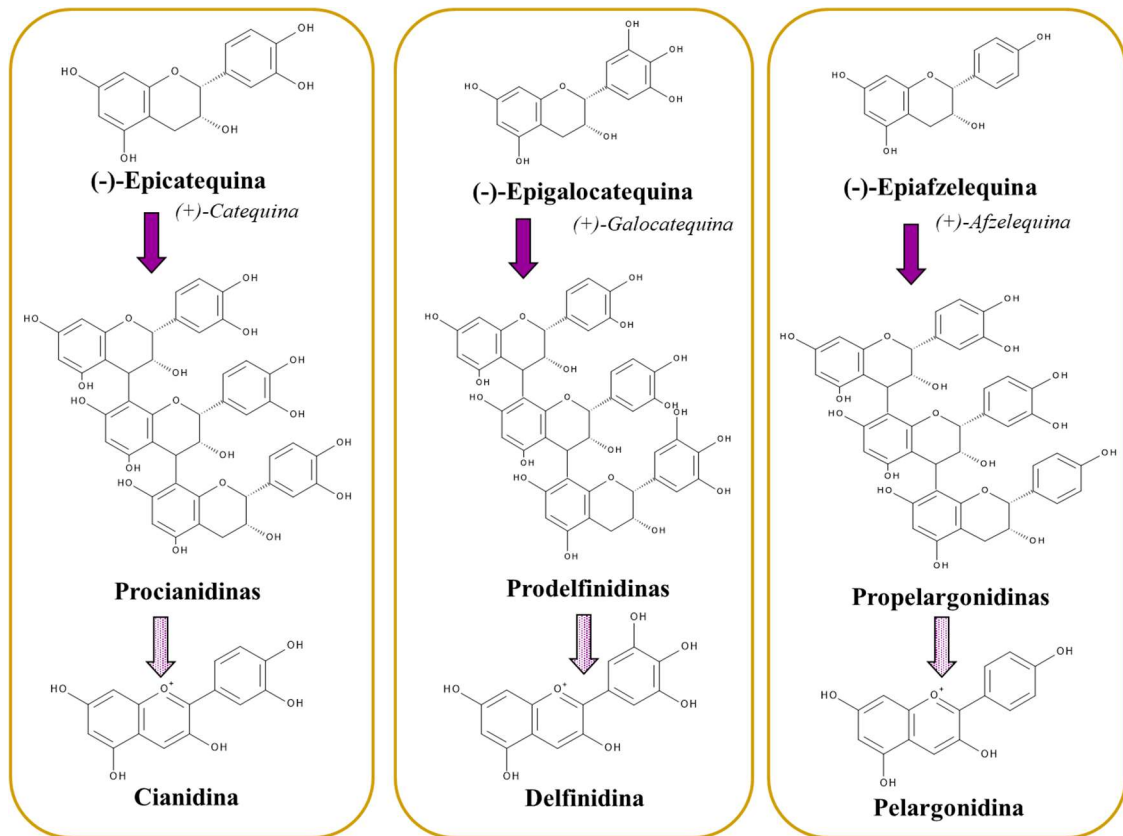


Figura 1. Principales estructuras poliméricas y monómicas de las proantocianidinas.

La estructura de las proantocianidinas depende del tipo y proporción de los diferentes monómeros que las componen y del número de monómeros que la constituye, conocido como el grado de polimerización (Mueller-Harvey *et al.*, 2019), la isomería geométrica en *cis* o *trans* (Klongsiriwet *et al.*, 2015) y la quiralidad R o S (Crozier *et al.*, 2008). Dicha diversidad en su estructura es determinante en las propiedades químicas de estos compuestos (Naumann *et al.*, 2013; Jonker y Yu, 2017), lo que dificulta la asociación de los TC con sus efectos sobre la fermentación ruminal (Barry y McNabb, 1999).

Los TC son agentes quelantes de diversos iones metálicos (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+}) y secuestradores de radicales libres (Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Frutos *et al.*, 2004a), que los convierte en potentes agentes reductores (McLeod, 1974; Makkar, 2003a), proporcionándoles actividad antioxidante (Hagerman *et al.*, 1998). Sin embargo, la propiedad más singular de los TC es su afinidad por las proteínas y otras moléculas tales como los polisacáridos, con las que tiende a formar complejos estables (McSweeney *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2006).

Los complejos formados entre las proteínas y los TC con enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e iónicas) son reversibles. En cambio, cuando los complejos presentan enlaces covalentes, generalmente, son irreversibles (Kumar y Singh, 1984). Las uniones por puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas son más frecuentes que las covalentes e iónicas (Spencer *et al.*, 1988; Poncet-Legrand *et al.*, 2006). La formación de enlaces covalentes puede modificar marcadamente las propiedades funcionales de la proteína debido a su carácter irreversible (Prigent *et al.*, 2007). El tipo de interacción producida entre los TC y las proteínas dependen de las características estructurales de ambos compuestos (Mueller-Harvey, 1999; Hofmann *et al.*, 2006), así como de las condiciones de la solución donde tenga lugar la interacción (Hagerman y Butler, 1978). El peso molecular, grado de polimerización, polímero principal, relación prodelphinidina:procianidina o la estructura y conformación de los TC influyen en la formación de los complejos TC-proteína (Lorenz *et al.*, 2014; Jonker y Yu, 2017). En el caso de las proteínas, su tamaño, conformación, peso molecular o el tipo de aminoácidos que las componen son factores asociados con el tipo de unión (Hagerman y Butler, 1981; Asquith y Butler, 1986). En cuanto a las condiciones del medio, el pH favorece la formación de complejos estables cuando se acerca al punto isoeléctrico de la proteína (Hagerman *et al.*, 1998; Mueller-Harvey, 2006), estando ello relacionado con la presencia de iones (Martin *et al.*, 1985; Perez-Maldonado *et al.*, 1995). En este sentido, los complejos TC-proteína se mantienen más estables en el rumen (pH: 3,5 - 8) que en el abomaso (pH < 2,5-3) y el duodeno (pH ≥ 8), lo cual permite la menor degradación ruminal de la proteína y una consecuente mejora de su eficiencia (McLeod, 1974; Frutos *et al.*, 2004a).

3.2. Determinación y cuantificación de los taninos condensados.

El análisis de los TC es complicado debido a la gran diversidad de sus estructuras, lo que hace difícil la comparación entre estudios. Se han desarrollado distintos métodos analíticos para determinar su presencia, contenido, estructura y actividad biológica (Schofield *et al.*, 2001). Los métodos colorimétricos son los más comúnmente usados para determinar la presencia y contenido de los TC en los forrajes debido a que son rápidos y fáciles de llevar a cabo (Piluzza *et al.*, 2014). Los métodos más extendidos que permiten la determinación de los TC libres (TCL), basados en la hidrólisis de las proantocianidinas a antocianidinas en un medio alcohol-ácido, son el butano-HCl (Porter *et al.*, 1985) y el vanilina-HCl (Broadhurst y Jones, 1978). Estos métodos se han

modificado para determinar también los TC ligados a proteína (TCP) y los ligados a fibra (TCF) (Terrill *et al.*, 1992b; Grabber *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay normalización ni en la determinación de los TC ni en los estándares utilizados para expresarlos, lo que provoca que los resultados sean muy variables (Makkar, 2003b; Frutos *et al.*, 2004a; Álvarez del Pino *et al.*, 2005). De manera frecuente se emplea el quebracho, la cianidina o la delfinidina como estándar externo en los análisis de butanol-HCl, pero podría ser inapropiado debido a la heterogeneidad de los TC entre las distintas especies de plantas (Piluzza *et al.*, 2014). Por ello, es recomendable usar como estándar los TC extraídos de las plantas sobre las que vamos a realizar los análisis frente al uso de estándares comerciales externos (Hagerman, 1988; Álvarez del Pino *et al.*, 2005). Sin embargo, para estudios con varias especies cuyos TC están constituidos por el mismo polímero principal puede ser factible el uso como estándar de los TC purificados de una de las especies analizadas (Wolfe *et al.*, 2008).

Para estudiar el grado de polimerización, la ratio *cis/trans* o la ratio PD/PC de los TC se emplean técnicas cromatográficas como la tiólisis o floroglucinólisis (Gea *et al.*, 2010; Tibe *et al.*, 2011; Hixson *et al.*, 2015) o más recientemente equipos de resonancia magnética nuclear, MALDI TOF MS o UPLC-MS/MS (Stringano *et al.*, 2011; Engström *et al.*, 2014; Zeller *et al.*, 2015). Para conocer los efectos y el alcance de la actividad biológica de los TC se han desarrollado técnicas que evalúan su capacidad de precipitación de proteínas, como son las pruebas de difusión radial (Hagerman, 1987) o los ensayos con bloqueantes de los TC como el polietilenglicol (PEG) (Álvarez del Pino *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2015).

3.3. Distribución y localización de los taninos condensados en las plantas.

Los TC tienen una amplia distribución en el reino vegetal, encontrándose fundamentalmente en árboles del género *Pinus*, *Acacia*, *Quercus*, arbustos como la familia *Rosaceae* (Ben Salem, 1998; Piluzza *et al.*, 2014) y en leguminosas forrajeras (McMahon *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2004a) como son la esparceta, la zulla y el *lotus* (*L. pedunculatus* o *corniculatus*).

Los TC se sintetizan mediante un orgánulo derivado del cloroplasto, el taninosoma, y se almacenan principalmente en las vacuolas de las células vegetales (Wang *et al.*, 2015; Jonker y Yu, 2017) para evitar la interacción con cualquier enzima involucrada en el metabolismo primario de la planta (McMahon *et al.*, 2000; Piluzza *et*

al., 2014). Los TC presentes en las vacuolas de las células de la hoja se agotan a medida que la hoja envejece, sugiriendo algunos autores que las plantas pueden reciclar estos compuestos (Lees *et al.*, 1995). Estos compuestos pueden también estar distribuidos en células de la raíz, tallo, corteza, flores y semillas de muchas leguminosas forrajeras (Piluzza *et al.*, 2014). En general, los TC son más abundantes en aquellas partes de más valía para la planta (hojas nuevas y flores) y más susceptibles de ser consumidas por los herbívoros (Álvarez del Pino *et al.*, 2001; Frutos *et al.*, 2004a), aunque la localización específica depende de cada especie. En esparceta, los TC se presentan en cantidades variables en todos los tejidos, pero con mayor concentración en las hojas (Lees *et al.*, 1995; Piluzza y Bullitta, 2010). La zulla contiene mayor concentración de TC en las hojas y flores que en el tallo (Stienezen *et al.*, 1996; Piluzza y Bullitta, 2010). Así, los TC en la alfalfa se detectan principalmente en la cubierta de la semilla (Koupai-Abyazani *et al.*, 1993), en la flor en el trébol blanco (Burggraaf *et al.*, 2003) y en tallos, pecíolos y flores en *L. corniculatus* (Morris *et al.*, 1993).

3.4. Factores que influyen en el contenido de taninos condensados de las leguminosas.

Los contenidos varían según la especie forrajera, tal como se ha apuntado anteriormente. En la esparceta fresca, los contenidos de TC totales (TCT) oscilan entre 25-100 g de TC/kg MS (Aufrère *et al.*, 2008; Theodoridou *et al.*, 2012), los TC libres (TCL) entre 32-55 g de TC /kg MS, TC ligados a proteína (TCP) 22-38 g de TC /kg MS y TC ligados a fibra (TCF) 5-6 g de TC /kg MS (Lorenz *et al.*, 2010; Jonker y Yu, 2017; Girard *et al.*, 2018). En la zulla los contenidos en TCT se sitúan entre 30-120 g de TC /kg MS (Waghorn *et al.*, 1998; Molle *et al.*, 2009), estando las fracciones de TCL, TCP y TCF entre 35-84, 9-35, 1-20 g de TC /kg MS, respectivamente (Terrill *et al.*, 1992b; Douglas *et al.*, 1999; Jonker y Yu, 2017). La alfalfa es considerada leguminosa libre de TC, resultando su contenido total entre 0,2-0,5 g de TC /kg MS (Tavendale *et al.*, 2005; Jonker y Yu, 2017). Esta amplitud en el rango de contenidos y distribución de las fracciones de los TC en los forrajes depende tanto de la propia planta como de factores medioambientales (McMahon *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2002).

Entre los factores ligados a la planta, destacan el género, la especie y la variedad. La concentración de TC en la planta viene determinada principalmente por la genética (McMahon *et al.*, 2000), encontrándose diferencias importantes en los contenidos y

estructura química de los TC en plantas de la misma familia, del mismo género e incluso entre diferentes variedades de la misma especie (Azuhnwi *et al.*, 2013b; Hatew *et al.*, 2015; Jonker y Yu, 2017). El contenido y distribución de los TC dependen de la relación hoja:tallo, que varía con la edad y el estado fenológico (Borreani *et al.*, 2003; Theodoridou *et al.*, 2011a) debido a que la mayor parte de los TC se encuentran en las hojas, flores y frutos (Lees *et al.*, 1995; Frutos *et al.*, 2002). Generalmente, se asocia una disminución de los TC con el avance en la madurez de la planta (Bal *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015). Aunque las variaciones en el contenido de TC según el estado fenológico de la planta están asociadas a la diferente demanda energética. Las plantas en crecimiento dedican sus recursos energéticos a la producción de biomasa, mientras que durante la floración cuando se reduce el crecimiento, el exceso de carbono puede estar disponible para una mayor síntesis de TC (Iason *et al.*, 1993). Sin embargo, existen discrepancias en el efecto del estado fenológico sobre el contenido de TC. En la esparceta se ha encontrado una disminución en el contenido de TC a inicio de floración frente al estado vegetativo (Chung *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), mientras que Theodoridou *et al.* (2011a) observaron un incremento de TC durante la floración respecto al estado vegetativo, sin que existieran diferencias entre el inicio y final de floración. Otros estudios informaron que el contenido en TC se reduce a medida que avanza la floración (Theodoridou *et al.*, 2010; Guglielmelli *et al.*, 2011), mientras que Girard *et al.* (2018) no observaron diferencias en el contenido de TC desde la plena floración al final de floración. Algunos autores (Theodoridou *et al.*, 2010; Guglielmelli *et al.*, 2011) observaron un ligero incremento del contenido de TC durante la formación de semilla, mientras que Li *et al.* (2014) observaron un menor contenido de los TC respecto a la fase floración o el estado vegetativo. Apenas existen estudios sobre el efecto del estado fenológico en el contenido de TC en la zulla, aunque algunos autores mostraron que la etapa de formación de la vaina presentó el mayor contenido en TC respecto a los demás estados (Aissa *et al.*, 2015a; Aissa *et al.*, 2016). Parte de esta gran diversidad de resultados se debe a que el estado fenológico afecta al contenido en TC de diferente manera según la parte de la planta que se estudie, como son las hojas, tallos o flores (Piluzza *et al.*, 2000; Piluzza y Bullitta, 2010; Theodoridou *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Además, el estado fenológico también puede afectar a las características de la estructura química de los TC (Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2011a; Theodoridou *et al.*, 2011b) y a las diferentes fracciones de los TC. En este sentido, Li *et al.* (2014) estudiando la esparceta en estado vegetativo, de floración y con semilla madura encontraron una reducción de los TCT, los TCL y los TCP a medida que

avanzaba el estado fenológico, mientras que los TCF no se afectaron. En cambio, Girard *et al.* (2018) no encontraron ningún cambio en las distintas fracciones de los TC cuando compararon esparceta en estado vegetativo, en plena floración y al final de la misma.

Las diferencias citadas entre los distintos estudios podrían ser debidas a factores medioambientales que influyen sobre las concentraciones de los TC (Frutos *et al.*, 2002). La deficiencia hídrica o elevadas temperaturas provocan una mayor síntesis y concentración de los TC (McMahon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014), pudiendo incluso cambiar el patrón de distribución de las diferentes fracciones (TCL, TCP y TCF) de los TC (Iason *et al.*, 1995). La mayor intensidad de la luz y de las radiaciones solares también provoca una mayor concentración de los TC (Mole *et al.*, 1988). Cuando las condiciones y propiedades físicas del suelo afectan negativamente al desarrollo de la planta, se produce mayor síntesis y concentración de los TC (Kelman y Tanner, 1990), afectando incluso a la composición monomérica de los TC (Lascano *et al.*, 2001).

La conservación del forraje afecta al contenido en TC y a sus fracciones. La henificación del forraje puede dar lugar a la oxidación de los TC, reduciendo su actividad biológica, dependiendo de la temperatura, la luz ultravioleta y la duración de estas condiciones de secado a las que el forraje se expone (Wang *et al.*, 2015). En este sentido, la henificación en campo reduce un 76% el contenido en TCT respecto a la esparceta fresca (Aufrère *et al.*, 2008). La desecación con aire forzado a 30 °C no afectó a TCT ni de TCL mientras que redujo las fracciones de TCP (56%) y TCF (18%) frente a la esparceta fresca (Scharenberg *et al.*, 2007a). La desecación de la esparceta con aire forzado a 50 °C redujo el contenido de TCL frente a la liofilización (Wang *et al.*, 2008). Apenas existen estudios que comparen la zulla fresca y henificada, pero se ha descrito que la desecación de zulla con aire forzado redujo el contenido de TC por debajo del límite de detección (Aissa *et al.*, 2015b). En otros forrajes, la henificación en campo de *Lespedeza cuneata* redujo el 48% los TCL respecto al forraje fresco (Terrill *et al.*, 1990). Mientras que Scharenberg *et al.* (2007a) observaron que la desecación artificial a 30 °C de *Cichorium intybus* no modificó los contenidos en TCT y TCL, incrementó un 57% los TCP y disminuyó un 86% los TCF, y la misma desecación en *Lotus corniculatus* tampoco modificó el contenido en TCT, pero aumentó un 35% los TCL y disminuyó un 35% los TCP y un 50% los TCF respecto al forraje fresco. En *Dalea purpurea*, la henificación en

campo no alteró los contenidos de las fracciones de TC respecto al forraje liofilizado, salvo un incremento del 158% en los TCP (Huang *et al.*, 2016).

La conservación en forma de silo provoca cambios más destacados en las fracciones de TC que la henificación, reduciendo el contenido de TCL y aumentando los de TCP y TCF debido a la ruptura parcial de las células de la planta que permite a los TCL interaccionar con otras moléculas presentes en el forraje (Wang *et al.*, 2015; Mueller-Harvey *et al.*, 2019). La interacción de los TC con las proteínas del forraje en el silo reduce la proteólisis que tiene lugar durante el proceso de ensilado, resultando este fenómeno ventajoso porque mejora la calidad del silo (Albrecht y Muck, 1991; Theodoridou *et al.*, 2012). El efecto del ensilado puede ser diferente según la especie forraje y dichas diferencias pueden estar asociadas a la estructura de los TC, ya que los polímeros de PD podrían oxidarse más fácilmente que aquellos formados por PC (Foo y Porter, 1980). El ensilado de esparceta presentó similar contenido de TCT que la esparceta fresca (Scharenberg *et al.*, 2007a) pero menor TCL (45-77%), mayor TCP, y similar TCF (Scharenberg *et al.*, 2007a; Lorenz *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2018). Los efectos del ensilado sobre los TC de zulla han sido poco estudiados, se ha descrito que el ensilado no afectó a los TCT pero redujo el 90% de los TCL en favor de los TC ligados (Minnee *et al.*, 2002). Respecto a otras especies, el ensilado no afectó a las fracciones de TC en *Cichorium intybus* (Scharenberg *et al.*, 2007a), mientras que provocó una reducción de los TCL (42-83%) a la vez que se incrementan los TCP y TCF (86-1.132%) en *Dalea purpurea* y el *Lotus corniculatus* (Minnee *et al.*, 2002; Scharenberg *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2016). Además, el procesado del forraje previo a su ensilado puede influir en el contenido de TC. En este sentido, el picado de la esparceta antes de ensilar redujo el contenido de TCT (36%) con respecto a la esparceta fresca (Girard *et al.*, 2018), mientras que dicha reducción no se produjo cuando la esparceta se ensiló sin picar (Scharenberg *et al.*, 2007a). En *Lotus corniculatus* o *Dalea purpurea*, el picado previo no provocó la reducción de TCT en silos fermentados durante un periodo similar a los anteriores estudios (Huang *et al.*, 2016; Girard *et al.*, 2018). Además de la influencia de la especie forrajera, los efectos de la conservación sobre las fracciones de TC pueden variar según las variedades como describieron Lorenz *et al.* (2010) al ensilar distintas variedades de esparceta. Incluso diferentes estados fenológicos dentro de una misma especie y una misma variedad pueden influir en los efectos de la conservación sobre las fracciones de TC. Así, Girard *et al.* (2018) observaron una reducción de los TCL en *Lotus corniculatus*

var. Polom y var. Bull y un incremento de los TCP *Lotus corniculatus* var. Polom cuando se ensilaron en plena floración respecto al forraje fresco, mientras que cuando los forrajes se ensilaron al inicio de floración no se afectaron ni los TCT ni sus fracciones.

3.5. Efecto de la inclusión de los taninos condensados en la dieta de los rumiantes.

La actividad biológica de estos compuestos está condicionada por multitud de factores, lo que impide realizar una generalización de sus posibles efectos (Waghorn y McNabb, 2003). Los factores que determinan la actividad están relacionados con el tipo de TC y la concentración del mismo (Bueno *et al.*, 2008; Hassanat y Benchaar, 2013; Lorenz *et al.*, 2014; Hatew *et al.*, 2016), la especie rumiante que los consume (Frutos *et al.*, 2004b; Bueno *et al.*, 2015) o la composición de la dieta (Deshpande y Salunkhe, 1982; Hervás *et al.*, 2003a; Martínez *et al.*, 2006).

De forma tradicional, los TC se denominaban “anti-nutrientes” porque a dosis elevadas se asociaban con efectos negativos en el animal como la reducción de la ingestión voluntaria, de la digestibilidad y del metabolismo del rumen (Frutos *et al.*, 2004a; Waghorn, 2008; Patra y Saxena, 2010), pudiendo provocar lesiones en el aparato digestivo como gastritis, úlceras o enteritis cuando las dosis son muy elevadas (> 7% en MS) (Dawson *et al.*, 1999; Hervás *et al.*, 2003b). La reducción de la ingestión voluntaria debido a una alta concentración de TC puede estar asociada con: i) la reducción de la palatabilidad debido a que los TC reaccionan con las mucoproteínas de la saliva provocando sensación de astringencia (Makkar, 2003a; Waghorn, 2008); ii) el enlentecimiento de la fermentación ruminal como consecuencia de la formación de complejos con los nutrientes (Kumar y Singh, 1984; Waghorn *et al.*, 1994); iii) y el desarrollo de aversiones provocadas por los efectos post-prandiales causados por los TC (Silanikove *et al.*, 2001). La disminución de la digestibilidad de la dieta asociada a la presencia de altas concentraciones de TC se debe principalmente: i) a la formación de complejos entre TC y los componentes de la dieta (Schofield *et al.*, 2001; Bento *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2006); ii) a la inhibición enzimática (Jones *et al.*, 1994; O’donovan y Brooker, 2001); iii) y a la acción sobre los microorganismos ruminales (Min *et al.*, 2002; Saminathan *et al.*, 2017). Sin embargo, los TC no afectan a la digestibilidad de los distintos componentes de la dieta en la misma medida, afectando en mayor grado a las proteínas que a los carbohidratos debido a su mayor afinidad por las primeras (Kumar y Singh, 1984; Waghorn *et al.*, 1987; McMahon *et al.*, 2000). Las modificaciones de la

digestibilidad generada por los TC se asocian con cambios en el patrón de fermentación ruminal, fundamentalmente producidos sobre los productos finales de la fermentación como son el metano, el amoníaco o los ácidos grasos volátiles (AGV) (Waghorn y Shelton, 1995; Kobeisy *et al.*, 1999).

Para evitar los efectos negativos de la ingestión de altas cantidades de TC, los rumiantes pueden desarrollar mecanismos adaptativos de carácter etológico y fisiológico, tales como la regulación del ritmo de ingestión (Shaw *et al.*, 2006), la combinación de especies vegetales con distintos tipos de compuestos secundarios que pueden inhibirse entre ellos (Rogosic *et al.*, 2006), la secreción de proteínas salivares específicas (Clauss *et al.*, 2005) o la modificación en las proporciones poblacionales de la microbiota ruminal (Smith, 1992). En el ámbito de la producción animal, se han desarrollado diversos tratamientos de naturaleza física o química capaces de desactivar actividad de los TC o de reducir su contenido en los forrajes (Makkar, 2003a; Mueller-Harvey, 2006). Entre los tratamientos físicos destaca el troceado de los forrajes para facilitar la oxidación de los TC (Makkar y Singh, 1993) y/o la conservación del forraje que reduce su contenido durante el proceso de almacenamiento y senescencia (Wang *et al.*, 2015). En cuanto a los tratamientos químicos, se utilizan agentes oxidantes, solventes orgánicos o agentes alcalinos con el objetivo de desactivar o disminuir el contenido de TC, aunque pueden provocar pérdidas de nutrientes solubles (Makkar y Singh, 1992; Mahmood *et al.*, 2007), excepto con el uso de polietilenglicol (PEG) o polivinilpirrolidona (Makkar, 2005).

El PEG es el agente bloqueante más utilizado en los trabajos de investigación para evitar los efectos de los TC sobre la ingestión voluntaria, la digestibilidad y la degradación los distintos sustratos (Makkar *et al.*, 1997; Decandia *et al.*, 2008; Dentinho *et al.*, 2018). Previene la formación de complejos TC-proteína, pudiendo desplazar la proteína de un complejo de TC-proteína preformado (Makkar *et al.*, 1995; Salem *et al.*, 2005). Es necesario señalar que la afinidad y el efecto del PEG sobre los TC no es universal y no siempre revierte los efectos de los TC (Frutos *et al.*, 2004b). Dicho efecto depende de diversos factores como la cantidad y el peso molecular del PEG, del contenido y la fuente de TC, e incluso de la especie rumiante que los consuma (Makkar *et al.*, 1995; Frutos *et al.*, 2004b; Tiemann *et al.*, 2008). Algunos estudios sobre forrajes que contienen TC (*Arctostaphylos canescens*, *Cassia fistula*, *Schinus molle* y *Chorisia speciosa*) muestran un incremento en la ingesta voluntaria de ovejas y cabras cuando se les administró PEG (Salem *et al.*, 2006; Narvaez *et al.*, 2011). Por el contrario, Molle *et al.* (2009) con zulla

fresca, Theodoridou *et al.* (2010) con esparceta y Scharenberg *et al.* (2007b) con esparceta deshidratada o ensilada no observaron efecto de la adición de PEG sobre la ingestión voluntaria. La presencia de PEG incrementó la digestibilidad *in vivo* de materia orgánica en esparceta deshidratada o ensilada (Scharenberg *et al.*, 2007b) y la degradabilidad en condiciones *in vitro* cuando se incubó esparceta fresca (Theodoridou *et al.*, 2011b). Sin embargo, otros estudios no han observado ningún efecto del PEG sobre la digestibilidad *in vivo* de la esparceta fresca o ensilada (Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2012) o de la zulla fresca (Molle *et al.*, 2009). La inclusión de PEG también incrementa la degradación *in vitro* de MS y proteína en forrajes tropicales (McSweeney *et al.*, 1999). En cambio, cuando se evalúa esparceta fresca o ensilada en presencia de PEG en condiciones *in situ* o *in vitro*, solo se ha incrementado la degradabilidad de la proteína pero no la de la materia seca (Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2011b; Theodoridou *et al.*, 2012). El PEG también se ha usado para evaluar los posibles efectos de los TC sobre los parámetros de la fermentación ruminal (Hervás *et al.*, 2003a; Theodoridou *et al.*, 2011b; Calabrò *et al.*, 2012), que serán estudiados con más profundidad en los siguientes apartados.

En los últimos años se ha estudiado ampliamente el potencial beneficioso de los TC, tanto incorporando forrajes ricos en estos compuestos secundarios en la dieta de los rumiantes como incluyéndolos en el concentrado mediante extractos naturales, como por ejemplo el quebracho (*Schinopsis balansae*) (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005b; Patra y Saxena, 2011; Piluzza *et al.*, 2014; Mueller-Harvey *et al.*, 2019). Los principales efectos beneficiosos buscados a nivel ruminal son reducir las emisiones de CH₄ con la consiguiente mejoría de la eficiencia energética y la reducción de la degradación de la proteína (Bueno *et al.*, 2015; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015; Hatew *et al.*, 2016). El CH₄ se produce como subproducto de la fermentación ruminal y conlleva pérdidas de energía superiores al 12% (Johnson y Johnson, 1995; Martin *et al.*, 2010). El efecto protector de los TC sobre la degradación de la proteína en el rumen permite que llegue más cantidad de proteína al intestino delgado mejorando su aprovechamiento y reduciendo la excreción de nitrógeno a través las heces y la orina, disminuyendo así las emisiones de N₂O (Mueller-Harvey, 2006). Además, el CH₄ y el N₂O son considerados como los gases de efecto invernadero más potentes, dado el gran impacto que tienen estos gases sobre el cambio climático se está implementando el uso de los TC como una herramienta para

reducir su producción por parte de los rumiantes (Steinfeld *et al.*, 2006; Steinfeld y Gerber, 2010; Gerber *et al.*, 2013).

En cuanto a los estudios relacionados con el efecto de los TC sobre los rendimientos productivos y reproductivos, el estado sanitario y la calidad de los productos los resultados son variables. Se ha observado que la inclusión de cantidades moderadas de TC tiene efectos beneficiosos sobre la ganancia media diaria (Speijers *et al.*, 2004; Ramírez-Restrepo *et al.*, 2005a), mayor producción de leche en ovino (Bonanno *et al.*, 2016) y en vacuno (Dey y De, 2014) o mayor producción de lana (Terrill *et al.*, 1992a; Wang *et al.*, 1996; Min *et al.*, 2001). Sin embargo, la bibliografía no es concluyente dado que otros ensayos observaron que la inclusión de TC redujo la ganancia de peso (Terrill *et al.*, 1992a; Douglas *et al.*, 1999), la producción de leche (Grainger *et al.*, 2009) y de lana (Barry, 1985; Makkar, 2003a) o no presentó efecto sobre estos rendimientos (Min *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2007). El aumento en los rendimientos se asocia principalmente con la elevada capacidad de los TC para unirse a las proteínas, aumentando su protección y reduciendo su degradación en el rumen, lo que lleva a una mayor disponibilidad de aminoácidos esenciales para ser absorbidos (Patra y Saxena, 2011; Piluzza *et al.*, 2014), así como a la reducción de pérdidas energéticas por las emisiones de CH₄ (Bodas *et al.*, 2012). Además, los TC en la dieta pueden generar una mejora de la salud general debido a que su presencia se relaciona con una reducción de la infestación por nematodos (Hoste *et al.*, 2006; Azuhwi *et al.*, 2013a) o una disminución de la incidencia de timpanismo que pueden sufrir los animales en pastoreo (McMahon *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2012). La presencia de TC también puede afectar a la eficiencia reproductiva, aumentando las tasas de ovulación y fecundación y reduciendo las pérdidas embrionarias debido a que mejoran el entorno uterino para la concepción, implantación y desarrollo del feto (Min *et al.*, 2001; Ramírez-Restrepo *et al.*, 2005c). Dichos efectos pueden estar relacionados con una mayor concentración de aminoácidos esenciales en el plasma que mejoran las funciones reproductivas (Waghorn *et al.*, 1990). Por último, los TC pueden influir en la calidad de los productos de los animales favoreciendo una composición en ácidos grasos más saludables (Buccioni *et al.*, 2015; Girard *et al.*, 2016; Lobón *et al.*, 2017a) o mejorando la vida útil de la carne debido a la capacidad antioxidante de estos compuestos (Luciano *et al.*, 2009; Vasta y Luciano, 2011; Di Trana *et al.*, 2015).

4. EFECTO DE LOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL.

4.1. Mecanismos de acción de los taninos condensados en el rumen.

La presencia de TC en el rumen puede provocar una disminución de la degradación de los distintos componentes de la dieta (Leinmüller *et al.*, 1991; Scalbert, 1991; Mueller-Harvey, 1999), debido a: i) la privación del sustrato (McAllister *et al.*, 1994; McMahan *et al.*, 2000); ii) la inhibición enzimática (Bae *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994); iii) y/o a la acción directa sobre microorganismos ruminales (Leinmüller *et al.*, 1991; Scalbert, 1991; McMahan *et al.*, 2000; McSweeney *et al.*, 2001a).

4.1.1. Privación del sustrato.

La capacidad de los TC para formar complejos con proteínas y carbohidratos (Min *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2006; Mueller-Harvey, 2006), así como con iones metálicos, que los hace inaccesibles para los microorganismos ruminales (Santos-Buelga y Scalbert, 2000), provoca una reducción de la actividad fermentativa y de la multiplicación celular (McSweeney *et al.*, 2001a; Bento *et al.*, 2005; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015) que reduce la degradación de los nutrientes que llegan al rumen.

4.1.2. Inhibición enzimática.

La presencia de TC puede provocar una precipitación de las enzimas extracelulares de los microorganismos ruminales, impidiendo su adhesión a los sustratos (Barry y Manley, 1984; O'donovan y Brooker, 2001) e inhibiendo y disminuyendo su actividad (McAllister *et al.*, 1994; Barahona *et al.*, 2006; Dentinho *et al.*, 2014). El grado de inhibición de las enzimas presentes en el rumen depende de: i) la cantidad de proteína en la dieta; ii) las cantidades relativas de diversas enzimas en la dieta y el estado en que se encuentran; iii) la formación de complejos TC-proteína antes y después de la ingestión; y iv) cómo las enzimas pueden ser afectadas por el pH, el tipo de TC, la especie y la edad del animal (Theodoridou, 2010). Los TC pueden inhibir varios tipos de enzimas (proteasas, pectinasas, amilasas, celulasas y lipasas) pero afectan en mayor medida a aquellas que se encuentran libres frente a las que están unidas a los microorganismos ruminales (Van Soest, 1994). Sin embargo, la unión de los TC con las enzimas, no implica necesariamente una disminución de su actividad fermentativa, debido a que algunos

microorganismos aumentan la actividad de otras enzimas para compensar dicha inhibición (Makkar *et al.*, 1988; Bae *et al.*, 1993).

4.1.3. Acción sobre los microorganismos ruminales.

Los TC pueden actuar directamente sobre los microorganismos produciendo cambios en la pared celular que altera la permeabilidad de sus membranas (McSweeney *et al.*, 2001a; Patra y Saxena, 2011; Jayanegara *et al.*, 2015a). Esto provoca una reducción del ritmo de crecimiento y de reproducción de los microorganismos lo que se refleja en una disminución de la actividad fermentativa en el rumen (Leinmüller *et al.*, 1991; Scalbert, 1991). La magnitud del efecto depende de la especie de microorganismo y del tipo o fuente de TC (Patra y Saxena, 2011). Los TC tienen la capacidad de reducir las poblaciones bacterianas fibrolíticas (McSweeney *et al.*, 2001b; Jayanegara *et al.*, 2015a) y proteolíticas (Jones *et al.*, 1994; Min *et al.*, 2002), así como la actividad de los hongos (Barahona *et al.*, 2006). El efecto de los TC sobre los protozoos es variable, existiendo estudios que muestran un incremento (Chiquette *et al.*, 1988; Terrill *et al.*, 1992a), una disminución (Jayanegara *et al.*, 2015a; Saminathan *et al.*, 2017) y otros estudios que no observan efecto (Benchaar *et al.*, 2008).

Algunos microorganismos se protegen de los TC mediante la síntesis en su pared celular de un glicocálix o matriz extracelular de polisacáridos (O'donovan y Brooker, 2001; Krause *et al.*, 2005), la secreción de compuestos que neutralizan su acción, y/o la síntesis de enzimas resistentes a los TC (Scalbert, 1991). Se ha señalado que las bacterias ruminales podrían llegar a disociar el complejo TC-proteína en condiciones favorables (Foley *et al.*, 1999). Sin embargo, en la actualidad, la degradación ruminal de estos compuestos mediante la ruptura de los enlaces carbono-carbono no ha podido ser demostrada ni en condiciones *in vitro* (Patra y Saxena, 2011) y aún sería más difícil en *in vivo*, dadas las condiciones de anaerobiosis en el rumen (McSweeney *et al.*, 2001a).

4.2. **Parámetros de la fermentación *in vitro*.**

Para el estudio de estos parámetros de la fermentación ruminal se pueden realizar ensayos *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, aunque los resultados que proporcionan varían en función del método utilizado (Khalilvandi-Behroozyar *et al.*, 2010; Jayanegara *et al.*, 2012; Theodoridou *et al.*, 2012). El método *in vitro* es una técnica bastante idónea ya que presenta una estrecha relación entre la degradación y fermentación ruminal con la

producción de gas (Menke *et al.*, 1979; Getachew *et al.*, 1998). Cuando un sustrato se fermenta *in vitro* con líquido ruminal tamponado produce gases (principalmente CO₂ y CH₄), ácidos grasos volátiles y síntesis de células microbianas (Getachew *et al.*, 1998). Sin embargo, en los ensayos de producción de gas *in vitro* una parte del gas producido tiene un origen directo como resultado de la fermentación de los componentes de la dieta (CO₂ y CH₄), y otra parte tiene un origen indirecto porque se produce a partir de la amortiguación (buffer) de los AGV (CO₂ liberado desde el buffer de bicarbonato) (Getachew *et al.*, 1998).

La magnitud del efecto de los TC sobre la fermentación ruminal depende de numerosos factores como son el contenido y el tipo de TC (Getachew *et al.*, 2008; Huyen *et al.*, 2016), el animal rumiante (Frutos *et al.*, 2004b; Bueno *et al.*, 2015), los ingredientes de la dieta y/o el tiempo de incubación evaluado (Hervás *et al.*, 2003a; Martínez *et al.*, 2006). En esta línea, los TC del quebracho son profisetidinas, las cuales son estructuras más compactas y menos accesibles que otros TC como las procianidinas y prodelfinidinas que están presentes en la esparceta y la zulla, lo cual hace que tengan menos actividad biológica (Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Schofield *et al.*, 2001).

4.2.1. Degradabilidad de la materia seca (MS) o materia orgánica (MO).

Los TC en cantidades moderadas reducen la degradación ruminal de los carbohidratos (Barry *et al.*, 1986; Waghorn *et al.*, 1987; Jayanegara *et al.*, 2015a; Orlandi *et al.*, 2015) y de las proteínas (Mueller-Harvey, 2006; Aufrère *et al.*, 2008; Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2012) a través de los diferentes mecanismos expuestos en el apartado anterior. De manera que, dichos efectos de los TC sobre las proteínas y los carbohidratos darán lugar una reducción la degradación de la MS (DMS) y la MO (DMO) debido a los cambios que provocan los TC sobre el patrón de fermentación ruminal (Kobeisy *et al.*, 2000).

La degradabilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) y la MO (DIVMO) puede verse reducida debido a los TC del quebracho (Frutos *et al.*, 2004b; Castro-Montoya *et al.*, 2018), dependiendo su efecto de la dosis de TC de quebracho añadido, reduciéndose la DIVMS con 100 g/kg pero no con 50 g/kg respecto a una dieta sin TC (Getachew *et al.*, 2008). Dicho efecto depende de la dieta donde se incluyen, como así observaron Hervás *et al.* (2003a) al incluir quebracho en heno de alfalfa, paja de cebada o *Erica arbórea* y Martínez *et al.* (2006) cuando incluyeron quebracho en una dieta basada en trigo o maíz.

De igual forma el tiempo de incubación también influye en el efecto de los TC sobre la degradabilidad, siendo los efectos de los TC más visibles cuando la incubación es prolongada, como observaron Hervás *et al.* (2003a) al incubar dietas con TC de quebracho durante 24 y 96 h.

Hay controversia en cuanto al efecto de los TC de la esparceta sobre la DIVMS y DIVMO. Theodoridou *et al.* (2011b) no encontraron efecto de los TC de esparceta sobre la DIVMO cuando se incubó durante 24 h con y sin PEG. Mientras que Niderkorn *et al.* (2012) observaron una reducción de la DIVMS y DIVMO debido al efecto de los TC de la esparceta al incubar durante 24 h *Dactylis glomerata* mezclada con diferentes proporciones de esparceta con y sin PEG. Por otro lado, la esparceta ha mostrado una menor DIVMS que la alfalfa cuando se ha incubado fresca en Rusitec durante 48 h (McMahon *et al.*, 1999) o henificada mediante la técnica de producción de gas *in vitro* durante 24 horas (Toral *et al.*, 2016). Sin embargo, Guglielmelli *et al.* (2011) mostraron una mayor DIVMO en henos de esparceta elaborados a diferentes estados fenológicos que en el heno de alfalfa cuando se incubaron durante 48 h, debido a un menor contenido en fibra de los henos de esparceta. En cuanto a la zulla existen pocos estudios *in vitro*, Douglas *et al.* (1999) encontraron una DIVMS similar entre zulla y *L. corniculatus* debido a la similitud de su composición química y su contenido en TC. Mientras Stienezen *et al.* (1996) observaron mayor digestibilidad *in vivo* de la zulla en ovejas a las que se les administró PEG que en aquellas no lo tomaron. En los estudios *in situ*, el silo de esparceta ha mostrado una menor DMS que cuando se incubó con PEG (Theodoridou *et al.*, 2012). La esparceta también presentó menor DMS que la alfalfa cuando se compararon en fresco, pero no cuando se incubaron como heno (Aufrère *et al.*, 2008). La esparceta presentó mayor DMO que la alfalfa cuando se incubaron en fresco o henificada en ganado vacuno (Chung *et al.*, 2013).

En relación al estado fenológico, el avance de la madurez en los forrajes provoca una reducción de la degradación de sus componentes (Ammar *et al.*, 1999). En la esparceta, la DIVMO disminuyó entre el estado vegetativo hasta el final de floración (Bal *et al.*, 2006). En este sentido, Theodoridou *et al.* (2011b) observaron una mayor DIVMO al inicio que al final de la floración cuando incubó esparceta fresca durante 24 h. Por el contrario, Guglielmelli *et al.* (2011) mostraron una mayor DIVMO en las etapas de floración, coincidiendo con menor contenido de TC, que en las etapas vegetativa o de inicio de semilla cuando incubaron heno de esparceta durante 48 h. En cuanto a la

degradación *in situ*, Theodoridou *et al.* (2012) no observaron efecto del estado fenológico sobre la DMS cuando compararon esparceta ensilada al inicio y al final de la floración. Mientras que la DMS y la DMO aumentaron cuando al incubar esparceta fresca en estado vegetativo frente al inicio de floración (Aufrère *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2013) debido al incremento de la fracción fibrosa.

Los cambios que se producen sobre los forrajes durante la conservación podrían influir en la DIVMS o la DIVMO. Calabrò *et al.* (2005) encontraron una menor DIVMO en el heno y el silo que en la avena fresca. Sin embargo, la conservación no afectó a la DIVMO en otros forrajes como *Digitaria eriantha* (Tikam *et al.*, 2015) o en combinaciones de veza-avena y haba-cebada (Calabrò *et al.*, 2006). La conservación mediante el ensilado puede presentar mejor degradabilidad debido a que dicho proceso de conservación altera beneficiosamente la estructura de la pared celular de los forrajes facilitando el ataque de los microorganismos ruminales (Arroquy *et al.*, 2014). En este sentido, Huang *et al.* (2016) estudiando la conservación de la *Dalea purpurea*, un forraje rico en TC, encontraron que el heno presentaba menor DIVMO que el forraje fresco o el ensilado. No se han encontrado estudios sobre los efectos de la conservación en la degradación *in vitro* en esparceta o zulla. Pero en *in vivo*, la esparceta ensilada presentó mayor digestibilidad de la MO que la deshidratada (Scharenberg *et al.*, 2007b), mientras que la conservación (heno, silo y fresco) no afectó a la digestibilidad de la MS y MO en la zulla (Dentinho *et al.*, 2006).

4.2.2. Producción de gas.

Entre las estrategias utilizadas para reducir la producción de gas y evitar las pérdidas energéticas asociadas destaca la utilización de los TC con el fin de cambiar el patrón de fermentación hacia una mayor síntesis de proteína microbiana (Azuhwi *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b; Hassanat y Benchaar, 2013; Hatew *et al.*, 2015). Dicho efecto se produce gracias a un cambio en la disponibilidad de los nutrientes en presencia de TC, destinando una mayor proporción a la síntesis de proteína microbiana en detrimento de la empleada para la producción de AGV cadena corta (Getachew *et al.*, 2000; Baba *et al.*, 2002).

La inclusión de extracto de quebracho en la dieta de rumiantes reduce la producción de gas, tanto respecto a la dieta control como la adición de PEG, cuando se emplea en ensayos *in vitro* (Jayanegara *et al.*, 2015b; Pinski *et al.*, 2016), aunque el efecto

depende de la dosis. Getachew *et al.* (2008) no encontraron efecto en la producción de gas con la inclusión de 20 y 40 g/kg de TC de quebracho sobre heno de alfalfa incubado 72 h, pero la producción de gas se redujo con la inclusión de 60 g/kg. En este sentido, Castro-Montoya *et al.* (2018) tampoco encontraron efecto sobre la producción de gas cuando incluyeron 15 y 30 g/kg de TC de quebracho en una ración mixta para vacuno incubada 24 h. En cambio, Hassanat y Benchaar (2013) observaron una reducción de la producción de gas con de la inclusión de 20 g/kg de TC de quebracho en una ración mixta cuando se fermentó durante 24 h. Estas discrepancias pueden ser a las diferencias entre los tiempos de incubación, la dieta sobre la que se añade el quebracho o las características del inóculo ruminal, tanto según la especie de la que procede como la dieta que recibió (Frutos *et al.*, 2004b; Martínez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010).

Ha sido ampliamente demostrado que el uso de forrajes ricos en TC disminuye la producción de gas en comparación con forrajes sin TC (Bueno *et al.*, 2015; Rira *et al.*, 2015) o mediante el uso de PEG (Tiemann *et al.*, 2008). Los TC de la esparceta han demostrado su efectividad para reducir la producción de gas *in vitro* cuando se ha incubado esparceta con y sin PEG, tanto en fresco (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012) como en heno (Calabrò *et al.*, 2012). Este efecto de los TC de esparceta también se ha observado cuando se ha comparado la fermentación *in vitro* de esparceta y alfalfa en fresco (McMahon *et al.*, 1999) y en heno (Calabrò *et al.*, 2012; Toral *et al.*, 2016). Sin embargo, Guglielmelli *et al.* (2011) encontraron mayor producción de gas en el heno de esparceta que en el de alfalfa a pesar de usar los mismos sustratos que Calabrò *et al.* (2012), lo que puede ser consecuencia de un diferente tiempo de incubación (48 y 96 h, respectivamente) y al uso de diferentes especies animales como donantes de inóculo ruminal (vaca y búfalo, respectivamente). La producción de gas cuando se incubaron *in vitro* silos de esparceta y de alfalfa fue similar (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017).

El estado fenológico del forraje incubado también puede afectar a la producción de gas, debido a los cambios que se producen sobre la composición química y los TC (Aissa *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Girard *et al.*, 2018), aunque los resultados son contradictorios. Bal *et al.* (2006) observaron una reducción de la producción de gas a medida que la esparceta maduraba, estando asociada con un incremento de la fracción fibrosa. En el mismo sentido, Theodoridou *et al.* (2011b) mostraron una reducción de la producción de gas al final de la floración respecto al inicio de floración de la esparceta, asociado también a una reducción de la proteína y al incremento de la fibra sin que

existieran diferencias en el contenido en TC. Sin embargo, Guglielmelli *et al.* (2011) encontraron mayor producción de gas al final de la floración de la esparceta, que aunque tenía menos calidad en cuanto a su composición química respecto a los demás estados fenológicos, presentaba el menor contenido en TC. Otros tipos de forraje como *Trifolium pratense* y *Lolium perenne*, presentaron mayor producción de gas en las etapas de floración que en el estado vegetativo por su favorable composición química (Navarro-Villa *et al.*, 2011).

El tipo de conservación también puede afectar a la producción de gas como consecuencia del cambio en su composición química, incrementándose la producción de gas en los forrajes conservados respecto al forraje fresco (Calabrò *et al.*, 2005; Calabrò *et al.*, 2006; Tikam *et al.*, 2015). No se han encontrado estudios que hayan evaluado el efecto de la conservación en la producción de gas en la esparceta y la zulla, pero en estos forrajes además de los cambios en la composición química, como la disminución de proteína o el incremento de la fracción fibrosa (Niezen *et al.*, 1998; Aufrère *et al.*, 2008), pueden influir los cambios que se producen en los TC y sus fracciones con motivo de la conservación (Minnee *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015).

4.2.3. Producción de metano.

La reducción de las emisiones ruminales de CH₄ es de gran interés para aumentar la eficiencia energética de los alimentos (Martin *et al.*, 2010) y porque es un gas de efecto invernadero (Gerber *et al.*, 2013). Se han desarrollado diversas estrategias para mitigar dichas emisiones, entre las que se encuentra la inclusión de TC en la dieta de rumiantes (Bodas *et al.*, 2012; Hassanat y Benchaar, 2013; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). Los TC pueden reducir la producción de CH₄ mediante: (i) un efecto directo sobre bacterias metanogénicas ruminales (arqueas), así como por una disminución del número de protozoos simbióticos asociados a la producción de metano; (ii) y un efecto indirecto sobre la producción de hidrógeno, debido a una menor degradación del alimento, fundamentalmente de fibra (Tavendale *et al.*, 2005; Patra y Saxena, 2011; Piluzza *et al.*, 2014).

La inclusión de TC del quebracho en una dieta de forraje:concentrado (70:30; p:p) provocó una reducción de la producción *in vitro* de CH₄ (Jayanegara *et al.*, 2015b), aunque el efecto depende del contenido en TC. Hassanat y Benchaar (2013) observaron que la reducción se dio a partir de la inclusión de 100 g/kg de TC de quebracho, no

encontrando efecto con la adición de 20 y 50 g/kg. En este sentido, Pinski *et al.* (2016) tampoco encontraron una reducción en la producción *in vitro* de CH₄ al incluir concentraciones de 25, 50 y 75 g/kg TC de quebracho. Igualmente, la inclusión de 10 y 20 g/kg de TC de quebracho en una ración mixta para vacuno no afectó a la producción *in vivo* de CH₄ (Beauchemin *et al.*, 2007).

La inclusión en la dieta de forrajes ricos en TC también puede reducir la producción *in vitro* de CH₄, como así se observó al comparar diferentes variedades de esparceta incubadas durante 48 h con y sin PEG (Hatew *et al.*, 2015). Sin embargo, la producción de CH₄ fue similar cuando la esparceta se incubó durante 24 horas con y sin PEG (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012). Diversos estudios mostraron que las leguminosas con TC producen menores emisiones de CH₄ que las leguminosas sin TC (Woodward *et al.*, 2002; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005b; Waghorn, 2008). En este sentido, una menor producción de CH₄ ha sido encontrada en hojas de esparceta frente a hojas de alfalfa cuando se incubaron en Rusitec McMahon *et al.* (1999) y en heno de esparceta respecto a heno de alfalfa en un ensayo *in vivo* con vacuno (Chung *et al.*, 2013). Sin embargo, otros estudios no han mostrado diferencia en la producción de CH₄ entre la alfalfa y la esparceta cuando se incubaron *in vitro* como henos (Guglielmelli *et al.*, 2011) o como silos (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). De manera similar, la esparceta ha mostrado una producción de metano similar a la alfalfa cuando los forrajes se ofrecieron en fresco en un estudio *in vivo* (Chung *et al.*, 2013). Esta controversia puede ser debida a que el efecto sobre la producción de CH₄ no solo depende de la presencia de TC, sino que además este efecto depende del peso molecular y estructura de los TC (Hatew *et al.*, 2016; Huyen *et al.*, 2016; Saminathan *et al.*, 2016).

El avance del estado fenológico provoca un aumento de la porción fibrosa, con lo cual podría aumentar la producción de CH₄ (Johnson y Johnson, 1995; Beauchemin *et al.*, 2008). A su vez, un alto contenido en fibra, puede inhibir los protozoos que proliferan en simbiosis con la microbiota metanogénica, reduciéndose de esta forma la producción de CH₄ (Chaudhry y Khan, 2012). Así, Theodoridou *et al.* (2011b) encontraron una mayor producción de CH₄ en la esparceta fresca incubada *in vitro* durante 24 horas al inicio de floración que al final de la floración. Sin embargo, Guglielmelli *et al.* (2011) no observaron diferencias en la producción de CH₄ cuando incubaron *in vitro* durante 48 h henos de esparceta conservados en diferente estado fenológico a pesar de mostrar diferencias en la composición química y el contenido en TC. Lo mismo ocurrió cuando

se comparó esparceta fresca en estado vegetativo con el estado de inicio de floración durante un ensayo *in vivo* sobre vacuno (Chung *et al.*, 2013).

Al igual que ocurre con el estado fenológico, los cambios que se producen en la composición química o el contenido de TC debido a la conservación se pueden reflejar en la producción de CH₄. Además, la conservación puede provocar un cambio en las fracciones de TC, aumentando los TC ligados a otras moléculas (Wang *et al.*, 2015), interfiriendo en la producción de CH₄ debido a la privación de sustrato o la acción directa sobre los microorganismos metanogénicos (Tavendale *et al.*, 2005; Patra y Saxena, 2010). Sin embargo, no existen estudios en esparceta y zulla donde se evalúe el efecto de su conservación sobre la producción de CH₄.

4.2.4. Contenido de amoníaco.

La presencia de TC en la dieta se ha asociado con una reducción del contenido de amoníaco debido a que reducen la solubilidad y la degradación de las proteínas de la dieta en el rumen (Aerts *et al.*, 1999). Además, la presencia de TC provoca un menor ritmo de fermentación que permite una mejor sincronización entre el N y la energía, lo cual reduce el contenido en amoníaco y posibilita una mayor síntesis de proteína microbiana (Salem *et al.*, 2007).

Diversos estudios han demostrado que la presencia de TC de quebracho puede reducir el contenido de amoníaco, tanto en ensayos *in vivo* (Beauchemin *et al.*, 2007) como *in vitro* (Frutos *et al.*, 2004b). Dicha reducción depende de la dosis de TC de quebracho incluida en la dieta, de manera que mientras concentraciones de 20 g/kg de dieta no mostraron cambios en el contenido de amoníaco en ensayos *in vitro*, si lo hicieron concentraciones de 40 g/kg (Getachew *et al.*, 2008) y de 50 g/kg (Hassanat y Benchaar, 2013) incubadas en las mismas condiciones. En cambio, otros autores muestran el efecto reductor sobre el contenido en amoníaco a concentraciones próximas a los 20 g/kg de TC de quebracho (Pinski *et al.*, 2016; Castro-Montoya *et al.*, 2018). Dicha controversia puede deberse a la diferente composición de las dietas donde se incluyen los TC, especialmente en cuanto al contenido en proteína (Martínez *et al.*, 2006).

Se ha observado una reducción de amoníaco debido a la presencia de TC de esparceta frente al uso de PEG en estudios *in vitro* de esparceta fresca (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012) y en estudios *in vivo* con esparceta fresca, deshidratada

o ensilada (Scharenberg *et al.*, 2007b; Theodoridou *et al.*, 2010). Sin embargo, no observaron modificaciones en el contenido de amoníaco cuando se alimentaron ovejas a base de esparceta ensilada con y sin PEG (Theodoridou *et al.*, 2012). La zulla fresca presentó menor amoníaco ruminal frente a la adición de PEG en ensayos *in vivo* con ovejas (Stienezen *et al.*, 1996; Douglas *et al.*, 1999). La fermentación de esparceta produjo menos contenido de amoníaco que la alfalfa en técnicas *in vitro* cuando se incubaron tanto en fresco (McMahon *et al.*, 1999), henificadas (Guglielmelli *et al.*, 2011; Toral *et al.*, 2016) o ensiladas (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). Sin embargo, Chung *et al.* (2013) no observaron diferencias en el contenido ruminal de amoníaco al alimentar vacas con alfalfa o esparceta, aportadas tanto en fresco como henificadas. La zulla también presentó menor contenido amoníaco en condiciones *in vitro* que el *Trifolium repens*, un forraje con bajo contenido en TC (Schreurs *et al.*, 2007). La discrepancia entre los diferentes estudios podría ser debida a la cantidad de TC o de sus fracciones, a la actividad biológica de dichos TC o/y al contenido en PB de los forrajes.

El contenido en amoníaco también puede variar por el estado fenológico de la planta, ya que además de la disminución del contenido en proteína y TC asociada a la madurez de la planta (Bal *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014), se producen cambios en la estructura de los TC (Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2011b). Dichos cambios estructurales pueden afectar al peso molecular o la ratio PD/PC (Foo *et al.*, 1996; Foo *et al.*, 1997), y un aumento del polímero de prodelfinidina favorece la interacción con las proteínas (Andersson *et al.*, 2006; Jonker y Yu, 2017), influyendo en el efecto sobre la degradación de la proteína a nivel ruminal y por tanto sobre el contenido en amoníaco. Theodoridou *et al.* (2011b) mostraron mayor contenido en amoníaco al inicio que al final de floración de esparceta en condiciones *in vitro*, debido a su mayor contenido en proteína ya que el contenido en TC fue similar en ambos estados fenológicos. Por esta misma razón, la esparceta ha presentado mayor producción de amoníaco al inicio de floración que en estado vegetativo o al inicio de semilla cuando se incubó *in vitro* en forma de heno (Guglielmelli *et al.*, 2011) y cuando se usó como heno (Theodoridou *et al.*, 2010) y como silo (Theodoridou *et al.*, 2012) en ensayos *in vivo* con ovejas. En un ensayo *in vivo* con vacuno se observó mayor producción de amoníaco en la esparceta en estado vegetativo que al inicio de floración, debido fundamentalmente a su alto contenido en proteínas (Chung *et al.*, 2013).

Como hemos comentado para otros parámetros los cambios producidos en los forrajes a nivel de composición química y de TC debido al proceso de conservación podrían influir en los contenidos de amoníaco. Sin embargo, tan solo se ha encontrado un estudio donde compara el efecto de la deshidratación y del ensilado de esparceta en condiciones *in vivo*, observando que no hay efecto sobre el contenido ruminal de amoníaco (Scharenberg *et al.*, 2007b).

4.2.5. Ácidos grasos volátiles.

La producción de AGV procede fundamentalmente de los carbohidratos, a partir de los cuales se genera principalmente acético, propiónico y butírico (Van Houtert, 1993; Getachew *et al.*, 1998). La proteína contribuye de manera minoritaria a la producción de AGV, mediante la degradación de la estructura carbonada de los aminoácidos durante la fermentación (Van Soest, 1994). La degradación de los aminoácidos valina, leucina y prolina genera iso-butírico, iso-valérico y valérico, respectivamente (Zavaleta de Lucio, 2002). Durante la fermentación, los AGV pueden sufrir un proceso de interconversión, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta que un determinado AGV es producto final de la actividad de algunos microorganismos y a su vez es el sustrato de otros microorganismos. Así podemos observar que entre el 40 y el 80% del ácido butírico deriva del acético y de un 6 al 20% del acético proviene del butírico (Bergman *et al.*, 1965; Weston y Hogan, 1968). Los AGV presentan diferente proporción molar en el líquido ruminal o de incubación, siendo del 60-75% en el acético, 15-19% en el propiónico, 8-16% en el butírico y del 1-4% para el iso-butírico, valérico y el iso-valérico (Chung *et al.*, 2013; Hassanat y Benchaar, 2013; Bueno *et al.*, 2015). Las variaciones en estas proporciones molares informan que tipo de patrón de fermentación siguen los sustratos, diferenciándose principalmente entre fermentaciones acéticas o propiónicas, de manera que la ratio acético:propiónico ($C_2:C_3$) se ha usado ampliamente como parámetro para evaluar el tipo de fermentación (Blümmel *et al.*, 1997; Getachew *et al.*, 1998). Las fermentaciones acéticas producen mayor cantidad de gas y las propiónicas se asocian con una menor producción de gas (Wolin, 1960; Van Soest, 1994; Getachew *et al.*, 1998). Las fermentaciones propiónicas provocan una reducción de la relación $C_2:C_3$, lo que reduce la concentración de iones de H_2 libres, que son sustratos de bacterias metanogénicas, dando lugar a una menor producción de CH_4 (Carulla *et al.*, 2005; Beauchemin *et al.*, 2009). Dicho patrón de fermentación está determinado por el tipo de dieta, presentando los sustratos rápidamente fermentables (concentrados) una fermentación propiónica

frente a los lentamente fermentables (forrajes) que favorecen la fermentación acética (Getachew *et al.*, 1998; Russell, 1998).

Los efectos de los TC pueden verse reflejados tanto en la producción total de los AGV como en sus proporciones molares (Hassanat y Benchaar, 2013; Hatew *et al.*, 2015) y están relacionados con la disminución de la degradabilidad de la MO (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015) o con un aumento de la síntesis de proteína microbiana en detrimento de la de la producción total de AGV (Getachew *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2005). En primer lugar, se presenta el efecto de los TC sobre la producción total de AGV, y luego, sobre las proporciones molares más relevantes.

4.2.5.1. Producción total de ácidos grasos volátiles.

Diversos estudios *in vitro* han demostrado una reducción en la producción total de AGV en presencia de TC de quebracho (Frutos *et al.*, 2004b; Martínez *et al.*, 2006; Jayanegara *et al.*, 2015b). Sin embargo, dicho efecto depende del contenido en TC y de las condiciones del ensayo *in vitro*. Hassanat y Benchaar (2013) observaron una reducción de la producción total de AGV cuando la dosis fue igual o superior a 50 mg/kg de TC al incubar *in vitro* varios niveles de TC de quebracho en 200 mg de una ración mixta. En cambio, Getachew *et al.* (2008) incubando en las mismas condiciones 500 mg de heno de alfalfa con diferentes niveles de TC de quebracho, solo encontraron dicho efecto cuando la dosis fue igual o superior a 100 g/kg. Otros estudios han mostrado un efecto reductor de la producción total de AGV con niveles bajos de TC de quebracho (15-25 g/kg) en ensayos *in vitro* (Pinski *et al.*, 2016; Castro-Montoya *et al.*, 2018) El tiempo de incubación también puede determinar el grado de efecto de los TC de quebracho (Martínez *et al.*, 2006).

Los TC presentes en los forrajes también han mostrado una reducción de la producción total de AGV, aunque el tiempo de incubación puede ser un factor determinante. Dicho efecto reductor de los TC de la esparceta se observó cuando se incubó *in vitro* heno de este forraje con y sin PEG durante 96 h (Calabrò *et al.*, 2012), pero no cuando se incubó esparceta fresca durante 24 h (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012). Estudios *in vivo* con ovino tampoco han mostrado efecto de los TC de esparceta sobre la producción total de AGV, tanto cuando se aportaba en forma fresca, deshidratada o ensilada (Scharenberg *et al.*, 2007b; Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2012). En los estudios en los que se compara la fermentación *in vitro*

de la esparceta frente a la alfalfa, la esparceta ha mostrado una menor producción total de AGV tanto en fresco (McMahon *et al.*, 1999) como en forma de heno o silo (Toral *et al.*, 2016; Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). Sin embargo, otros autores han observado una mayor producción total de AGV en la esparceta frente a la alfalfa cuando los ensayos *in vitro* se realizan durante un periodo más largo (48 y 96 h), debido fundamentalmente al alto contenido de carbohidratos no estructurales de la esparceta respecto a la alfalfa (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012). En relación a ello, Schreurs *et al.* (2007) apuntan al mayor contenido de carbohidratos no estructurales como causa de la mayor producción total de AGV de la zulla en comparación al *Trifolium repens* durante una fermentación *in vitro* de 10 h. La producción total de AGV fue similar entre alfalfa y esparceta, cuando se administró tanto en fresca o como henificada a vacuno durante un ensayo *in vivo* (Chung *et al.*, 2013).

El estado fenológico de los forrajes incubados *in vitro* puede influir en la producción total de AGV, como ha sido observado en el heno de esparceta (Guglielmelli *et al.*, 2011) o sobre el *Trifolium pratense* y el *Lolium perenne* en fresco (Navarro-Villa *et al.*, 2011). Sin embargo, Theodoridou *et al.* (2011b) mostraron una producción similar cuando incubaron *in vitro* esparceta fresca a inicio y final de floración. Esta falta de efecto de estado fenológico también ha sido observada mediante un ensayo *in vivo* con vacuno usando esparceta fresca en estado vegetativo e inicio de floración (Chung *et al.*, 2013). En cambio, la esparceta ensilada a inicio y final de floración o la esparceta fresca a inicio de floración, final de floración e inicio de semilla presentan efecto del estado fenológico sobre la producción total de AGV cuando se han estudiado *in vivo* sobre ganado ovino (Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2012). Las discrepancias en el efecto del estado fenológico entre unos ensayos y otros se deben a la combinación de las diferencias en la composición química y en los TC.

La conservación puede reducir en la producción total de AGV, tal y como observaron Calabrò *et al.* (2006) cuando incubaron *in vitro* combinaciones de veza-avena y haba-cebada frescas y henificadas. Sin embargo, Calabrò *et al.* (2005) no observaron efecto del método de conservación al estudiar la fermentación *in vitro* de forraje de avena debido, probablemente, a la similar composición química de los sustratos. En este sentido, Scharenberg *et al.* (2007b) tampoco observaron diferencias entre esparceta henificada y ensilada en un ensayo *in vivo*.

4.2.5.2. Proporción de ácido acético (C₂) y propiónico (C₃).

La presencia de TC puede favorecer la fermentación propiónica en lugar de acética (Makkar *et al.*, 1995), aunque no siempre se registra este efecto. En algunos estudios, la inclusión de TC de quebracho no incrementa la producción y proporción de propiónico (Hervás *et al.*, 2003a; Frutos *et al.*, 2004b; Jayanegara *et al.*, 2015b; Castro-Montoya *et al.*, 2018) e incluso la disminuye debido al efecto bloqueante de los TC sobre el sustrato o los microorganismos (Martínez *et al.*, 2006; Getachew *et al.*, 2008). Sin embargo, de forma más generalizada se observa una reducción de la ratio C₂:C₃ (Beauchemin *et al.*, 2007; Getachew *et al.*, 2008; Jayanegara *et al.*, 2015b; Pinski *et al.*, 2016), aunque la magnitud del efecto depende del contenido de TC de quebracho incorporado a la dieta, así como del sustrato usado y el tiempo de incubación (Martínez *et al.*, 2006; Hassanat y Benchaar, 2013).

La fuente de TC también influye sobre estos parámetros y no se ha observado efecto de los TC de la esparceta cuando se incubó *in vitro* con y sin PEG, tanto en forma fresca (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012) como henificada (Calabrò *et al.*, 2012), ni cuando se usa *in vivo* como fresca, henificada o ensilada adicionándole PEG (Scharenberg *et al.*, 2007b; Theodoridou *et al.*, 2010; Theodoridou *et al.*, 2012). Aunque, los TC de esparceta tienen la capacidad de aumentar la proporción de propiónico y reducir la ratio C₂:C₃ en condiciones *in vitro* cuando se añaden como aditivo a una dieta basada en alfalfa (Hatew *et al.*, 2016), o cuando se han estudiado *in vitro* diversas variedades de esparceta de distinto origen mediante la adición de PEG (Hatew *et al.*, 2015). Cuando se ha comparado la esparceta con la alfalfa, los resultados son muy variables en función del tipo de ensayo. En este sentido, se ha registrado una mayor proporción de propiónico en la esparceta que en la alfalfa cuando se incubaron *in vitro* silos ambos forrajes durante 24 h (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017) y cuando se usaron tanto en fresco como en heno para un ensayo *in vivo* con vacuno (Chung *et al.*, 2013). Por otro lado, la incubación *in vitro* de ambos forrajes en fresco (McMahon *et al.*, 1999) o en heno (Guglielmelli *et al.*, 2011; Toral *et al.*, 2016) mostró una proporción de propiónico y una ratio C₂:C₃ similar entre ellos. Aunque el tiempo de incubación podría influir, ya que Calabrò *et al.* (2012) encontraron una menor producción de propiónico y una mayor ratio C₂:C₃ en la esparceta que en la alfalfa al incubar durante 96 h los mismos sustratos que Guglielmelli *et al.* (2011), mientras que ellos lo incubaron durante 48 h. Como en la mayoría de estudios *in vitro* de la esparceta, la zulla tampoco mostró un patrón de la fermentación similar al

Trifolium repens (Schreurs *et al.*, 2007), sin que los TC de la zulla fomentaran una fermentación propiónica.

En cuanto al efecto del estado fenológico, Guglielmelli *et al.* (2011) observaron una reducción de la ratio C₂:C₃ en estado vegetativo o de floración respecto al inicio de semilla cuando incubaron *in vitro* henos de esparceta durante 48 h. Sin embargo, Theodoridou *et al.* (2011b) no observaron diferencias en el contenido de propiónico ni en la ratio C₂:C₃ cuando incubaron *in vitro* durante 24 h esparceta fresca a inicio y final de floración que presentaban un contenido similar en TC. El efecto del estado fenológico sobre la ratio C₂:C₃ también se observó en ensayos *in vivo* con ovino, presentado menor ratio la esparceta ensilada al inicio que al final de floración y coincidiendo el mayor contenido en TC (Theodoridou *et al.*, 2012). Mientras que cuando se usó esparceta fresca se observó menor ratio al final de floración que en el inicio de floración e inicio de semilla, estando asociado un mayor grado de polimerización de los TC al final de la floración (Theodoridou *et al.*, 2010). En cambio, cuando se estudió la esparceta fresca en un ensayo *in vivo* con vacuno, el inicio de floración mostró menor proporción de propiónico y mayor ratio que el estado vegetativo, a pesar de presentar mayor contenido en TCL (Chung *et al.*, 2013). De manera, que no solo el contenido de TC podría influir, sino también sus características estructurales (Hatew *et al.*, 2016).

En relación al efecto de la conservación, la esparceta deshidratada y ensilada presentaron similares proporciones de propiónico cuando se han estudiado *in vivo* (Scharenberg *et al.*, 2007b). En cambio, forrajes como la avena o combinaciones de veza-avena y haba-cebada, fermentados *in vitro* mostraron una reducción de la concentración de propiónico sin afectar a la ratio C₂:C₃ cuando se incubaron en forma de heno o silo respecto al fresco (Calabrò *et al.*, 2005; Calabrò *et al.*, 2006).

4.2.5.3. Proporción de ácido valérico, iso-butírico e iso-valérico.

La producción de estos AGV puede reducirse porque los TC inhiben la degradación de las proteínas (Mueller-Harvey, 2006) o porque los TC favorecen la utilización de los iso-ácidos para la síntesis de proteína microbiana (Wegner y Foster, 1963; Martínez *et al.*, 2006). Los TC de quebracho reducen la proporción de valérico y de los iso-ácidos respecto a una dieta control o a la inclusión de PEG en condiciones *in vitro* (Frutos *et al.*, 2004b; Jayanegara *et al.*, 2015b). Dicho efecto depende de la concentración de TC, así cuando se adiciona una dieta con 20 g/kg de TC de quebracho

se reduce la proporción de valérico pero no de los iso-ácidos, mientras que con la adición de 50 g/kg de TC de quebracho se observa la reducción del valérico y los iso-ácidos (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat y Benchaar, 2013; Pinski *et al.*, 2016). Sin embargo, Castro-Montoya *et al.* (2018) mostraron una reducción de las concentraciones de valérico y los iso-ácidos con concentraciones de TC de quebracho más bajas (15-30 g/kg) que los anteriores estudios.

Los TC de esparceta tienen la capacidad de reducir las proporciones de valérico y de los iso-ácidos cuando se incluye como aditivo en dietas basadas en alfalfa incubadas *in vitro* (Hatew *et al.*, 2016). Igualmente, Calabrò *et al.* (2012) mostraron que los TC de esparceta reducen las proporciones del valérico y del iso-valérico, mientras que no observaron efecto sobre la proporción de iso-butírico cuando incubaron heno de esparceta con y sin PEG. Cuando se incubaron *in vitro* diversas variedades esparceta con y sin PEG, Hatew *et al.* (2015) encontraron una mayor proporción de valérico en la esparceta con PEG mientras que no hubo efecto en los iso-ácidos. El aporte de heno y ensilado de esparceta con y sin PEG a corderos durante un ensayo *in vivo*, no mostró ningún efecto de los TC sobre las proporciones del valérico y los iso-ácidos (Scharenberg *et al.*, 2007b). La esparceta presentó menor proporción de valérico e iso-ácidos que la alfalfa cuando los forrajes se incubaron *in vitro* en fresco (McMahon *et al.*, 1999), henificados (Toral *et al.*, 2016) y ensilados (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando el heno de alfalfa se compara con esparceta henificada en varios estados fenológicos y se producen incubaciones *in vitro* más largas que las anteriores, o no hay efecto entre los distintos forrajes o existe una mayor producción de valérico y de los iso-ácidos en la esparceta que en la alfalfa (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012). En un ensayo *in vivo* con vacuno donde se compara la esparceta con la alfalfa, tanto en fresco como en heno, no se han observado diferencias sobre la proporción del valérico y los iso-ácidos entre ambos forrajes (Chung *et al.*, 2013). Estas diferencias entre los ensayos pueden deberse a las diferencias de contenido en PB de los forrajes o la diferente actividad y contenido de los TC de la esparceta. La zulla presentó una mayor proporción de iso-ácidos que un forraje sin TC como el *Trifolium repens*, a pesar de tener un contenido similar en proteína, lo cual podría indicar que la incubación *in vitro* de 10 h pudo ser demasiado corta para observar los efectos de los TC de la zulla (Schreurs *et al.*, 2007).

El estado fenológico afectó a la proporción de los iso-ácidos, aunque no a la del valérico cuando se incubó *in vitro* esparceta henificada en diferentes estados fenológicos,

presentando los mayores niveles de iso-válérico en el estado de floración y los mayores niveles de iso-butírico en el estado de inicio de semilla (Guglielmelli *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se ha suministrado esparceta fresca con diferente estado fenológico a ganado vacuno, las proporciones de valérico y de los iso-ácidos han sido mayores en el estado vegetativo que al inicio de la floración (Chung *et al.*, 2013). Estos resultados van ligados tanto al contenido en PB de los forrajes en los distintos estados fenológicos, como al contenido en TC.

En cambio, la conservación no afectó a la proporción de valérico y los iso-ácidos cuando se ha suministrado esparceta deshidratada y ensilada a corderos en ensayos *in vivo* (Scharenberg *et al.*, 2007b). Dicha falta de efecto de la conservación sobre estos AGV, también se ha descrito en ensayos *in vitro* con heno y silo de *Andropogon gayanus* (Ribeiro *et al.*, 2014) o de *Avena sativa* (Calabrò *et al.*, 2005).

5. CAROTENOIDES Y TOCOFEROLES.

En la actualidad los consumidores demandan productos procedentes de animales criados en pastoreo, tanto por el aspecto saludable y nutritivo asociado a los productos procedentes de animales manejados en estas condiciones como por considerarse un sistema de explotación sostenible, natural y respetuosa con el medio ambiente (Prache *et al.*, 2005; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013; De Brito *et al.*, 2017). Sin embargo, dichos consumidores exigen garantías sobre la alimentación recibida por los animales (Bernués *et al.*, 2003), por lo que es necesario buscar herramientas que permitan certificar esta información.

La alimentación que reciben los animales destinados al consumo humano es considerada por los consumidores como uno de los factores extrínsecos de calidad más importantes (Casasús *et al.*, 2007), por lo que se deben buscar posibles “marcadores” que puedan relacionar el producto con el tipo de alimentación del animal. Los marcadores son compuestos químicos que están ligados a un tipo de alimento y que se acumulan o expresan en el producto final. Este concepto anteriormente expuesto, lo engloba el término “trazabilidad”, que está definida por la ISO 8402 como “la habilidad de rastrear la historia, aplicación, o localización de un elemento por medio de identificaciones registradas” (Charlier, 2003). Sin embargo, no siempre se dispone de esta información, por lo que es necesario desarrollar sistemas de biodetección que garanticen una adecuada trazabilidad del sistema usado para la alimentación del ganado.

Prache *et al.* (2005) propusieron diferentes compuestos presentes en los productos de los animales que podrían ser considerados como biomarcadores para la trazabilidad del sistema de alimentación en los rumiantes. Estos compuestos pueden ser *marcadores indirectos* procedentes del metabolismo de los animales como los ácidos grasos, *marcadores físicos* que basados en la composición isotópica del agua y la grasa de los productos animales o *marcadores directos* procedentes de compuestos de origen vegetal que el animal no puede sintetizar. De todos estos posibles marcadores, lo primero que se debe estudiar es su capacidad de discriminar el producto y clasificarlo según el régimen alimenticio recibido con un pequeño margen de error. Por lo tanto, es necesario buscar la combinación de dos o más marcadores que puedan indicar de manera más precisa la alimentación recibida por el animal, como pueden ser los carotenoides y las vitaminas liposolubles (A y E). Dichos compuestos se acumulan en diferentes tejidos y fluidos animales (Ochoa *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 2015) permitiendo su uso para discriminar el tipo de dieta empleada en la alimentación de los rumiantes a través de sus productos (Dunne *et al.*, 2009; D'Alessandro *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2014; Darwish *et al.*, 2016).

5.1. Características y propiedades de los carotenoides y las vitaminas liposolubles (A y E).

5.1.1. Carotenoides y vitamina A.

Los carotenoides son pigmentos biosintetizados, fundamentalmente, por organismos fotosintéticos como plantas y algas, así como algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Álvarez *et al.*, 2015). En las primeras etapas de la biosíntesis de carotenoides, un isopreno (C_5) experimenta sucesivas adiciones de unidades C_5 para el alargamiento de la cadena hasta que genera geranylgeraniol difosfato (C_{20}). La unión “cola-cola” de este último compuesto produce fitoeno, el primer carotenoide (C_{40}). Diferentes modificaciones sobre el fitoeno como la ciclación, la hidrogenación, la deshidrogenación, la migración del doble enlace, el acortamiento o la extensión de la cadena, el reordenamiento, la isomerización, la introducción de funciones de oxígeno o las combinaciones de estos procesos, dan como resultado más de 600 moléculas diferentes. Los carotenoides que están compuestos únicamente por carbono e hidrógeno se denominan carotenos ($C_{40}H_{56}$), y los que además contienen oxígeno se denominan xantofilas ($C_{40}H_{56}O_2$) (Rodríguez-Amaya, 2001; Nozière *et al.*, 2006).

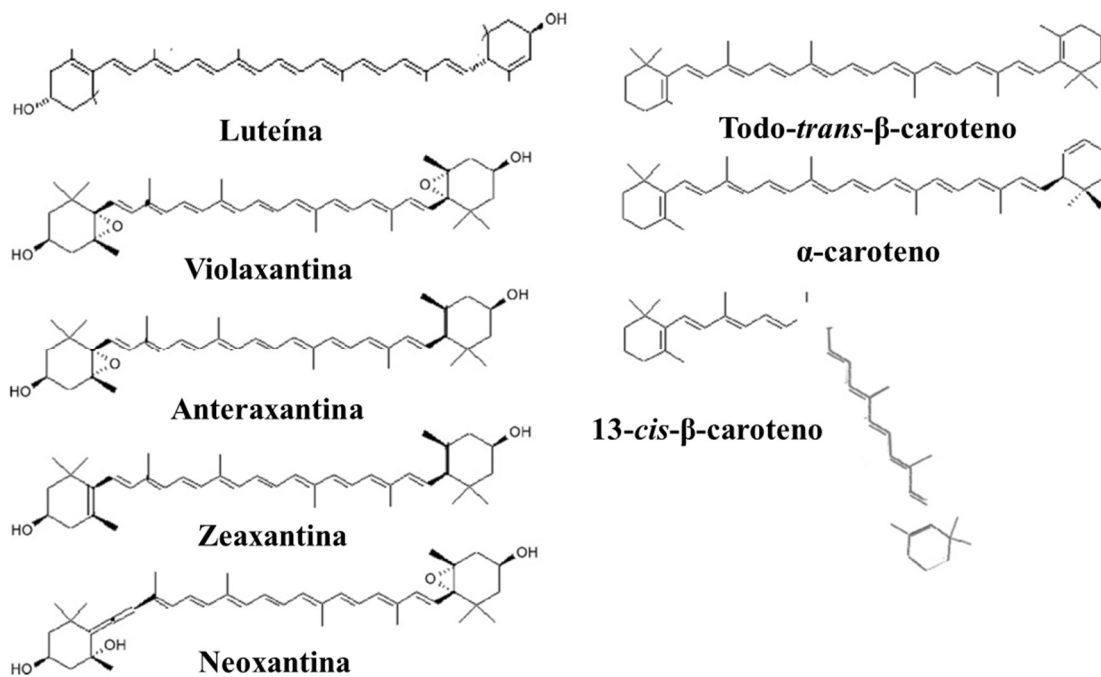


Figura 2. Estructura química de los principales carotenoides.

Las diferentes propiedades físico-químicas de los carotenoides dan lugar a sus diversas funciones. Los dobles enlaces conjugados de los carotenoides tienen una función de cromóforo, que les permite absorber la luz y otorgar color, sirviendo para la identificación y cuantificación de cada carotenoide. Estos dobles enlaces también dan lugar a isómeros *cis* y *trans* (Rodríguez-Amaya, 2001). El oxígeno puede provocar la degradación de los carotenoides, dependiendo de su disponibilidad y de la presencia de luz, enzimas y metales (Rodríguez-Amaya, 2001; Estévez Santiago, 2016). Sin embargo, los propios carotenoides pueden actuar como antioxidantes inactivando de radicales libres de oxígeno (Oroian y Escriche, 2015) y su eficacia depende del número de dobles enlaces conjugados presentes, siendo bastante activos el β-caroteno, zeaxantina, β-criptoxantina, y α-caroteno (Stahl y Sies, 2003). La solubilidad de los carotenoides difiere según sean carotenos o xantofilas, de tal modo que los carotenos son más solubles en solventes apolares y las xantofilas en solventes polares (Rodríguez-Amaya, 2001). Debido a su carácter lipofílico se encuentran en lugares como las membranas, aunque también están en ambientes acuosos por medio de asociaciones a proteínas o reacciones de glicosilación (Britton, 1995).

Los carotenoides y sus metabolitos participan en numerosas funciones, siendo su principal función ser precursor de la vitamina A (retinol; $C_{20}H_{30}O$) en mamíferos. Los

animales no pueden sintetizarla *de novo* por tanto debe formarse a partir de carotenoides con actividad provitamina A, como el α -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina y β -caroteno, siendo la actividad de este último sustancialmente mayor que la de otros carotenoides (Álvarez *et al.*, 2015).

La vitamina A no está presente en los vegetales y como hemos comentado anteriormente, se sintetiza a partir de los carotenos en el metabolismo de los animales. La vitamina A está compuesta por un anillo β -ionona hidrófobo y una cadena lateral isoprenoide conjugada que contiene un grupo polar en su extremo. La estructura básica de la vitamina A es el todo-*trans*-retinol, pero dado que contiene dobles enlaces puede presentar diferentes isómeros. El metabolismo del retinol genera una serie de derivados como el retinal, ácido retinoico y ésteres de retinilo, que presentan actividad de vitamina A (Debier *et al.*, 2005).

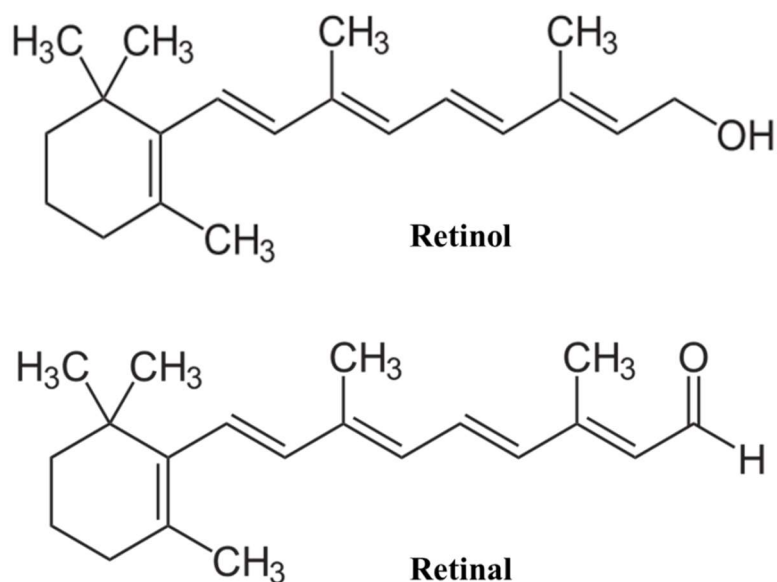


Figura 3. Estructura química de la vitamina A.

La vitamina A es esencial para el crecimiento y la diferenciación celular, la reproducción, el mantenimiento del sistema inmunológico y la visión, entre otros procesos (Nozière *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015). Además, se le atribuyen actividad antioxidante, siendo dicha actividad variable entre los compuestos que engloban a esta vitamina (retinol = retinal >> palmitato de retinol > ácido retinoico) (Debier y Larondelle, 2005). Por ejemplo, el retinal tiene una actividad del 90% y el deshidrorretinol del 40%. El ácido retinoico puede sustituirla en algunas de sus funciones (diferenciación celular) pero no en otras (fotopigmento). La vitamina A es sensible a la acción de la luz, el calor

y los agentes oxidantes, como resultado de la presencia de la cadena lateral insaturada. Por este motivo, la vitamina A sintética se encuentra en formas encapsuladas, a fin de brindar protección contra los efectos adversos de la luz y la oxidación (Ballet *et al.*, 2000).

5.1.2. Tocoferoles y vitamina E.

La vitamina E es el nombre genérico que engloba a dos tipos de compuestos, los tocoferoles y los tocotrienoles (Kalač, 2012). Los tocoferoles están generalmente presentes en todas las plantas y en casi todas las partes de la planta. Mientras que los tocotrienoles solo están presentes en un específico grupo de plantas y se encuentran exclusivamente en las semillas y frutos (McDonald *et al.*, 2011). Además de las plantas, estos compuestos pueden ser sintetizados por organismos fotosintéticos oxigenados, como las algas y algunas cianobacterias (DellaPenna, 2005).

Ambos compuestos están formados por un anillo aromático llamado cromanol, con un grupo hidroxilo y una cadena lateral isoprenoide saturada en el caso de los tocoferoles e insaturada con tres dobles enlaces en los tocotrienoles (McDonald *et al.*, 2011). Tanto tocoferoles como tocotrienoles presentan cuatro homólogos (α , β , γ y δ) diferenciados por el número y la posición de los sustitutos de metilo en el sistema de anillo de cromanol, donde α tiene tres sustitutos de metilo, β y γ dos y δ uno (DellaPenna, 2005; Havaux *et al.*, 2005). El α -tocoferol es la forma más activa de la vitamina E, presentando el β -, γ - y δ -tocoferol una actividad del 45%, 13% y 0,4% respecto al α -tocoferol (McDonald *et al.*, 2011).

La molécula de tocoferol contiene tres átomos de carbono asimétricos (quirales) ubicados en las posiciones 2', 4' y 8', lo cual permite que la aparición de estereoisómeros pudiendo presentar configuración R o S. La molécula del α -tocoferol con la configuración de D- α -tocoferol (o RRR- α -tocoferol) se caracteriza por tener la actividad más alta y estar presente de forma natural en las plantas (Scherf *et al.*, 1996). La forma DL- α -tocoferol con una proporción igual de las configuraciones R y S en cada uno de los tres carbonos quirales, da como resultado una mezcla equimolar de los ocho estereoisómeros posibles del α -tocoferol (RRR, RRS, RSR, RSS, SSS, SSR, SRS y SRR) (Slots *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2011), que se llama racémica o "todo rac" α -tocoferol (Weiser *et al.*, 1992).

La vitamina E es uno de los más abundantes agentes antioxidantes liposolubles que se encuentran en el plasma y las células de los mamíferos superiores, que junto con la vitamina A constituyen un sistema antioxidante vital por su acción frente a los radicales libres (Sayago *et al.*, 2007). Dichos radicales libres pueden dañar los fosfolípidos insaturados de las membranas celulares y grupos sulfhidrilos de las enzimas o el ADN, siendo esencial reducir su actividad para proteger la salud del animal (McDonald *et al.*, 2011).

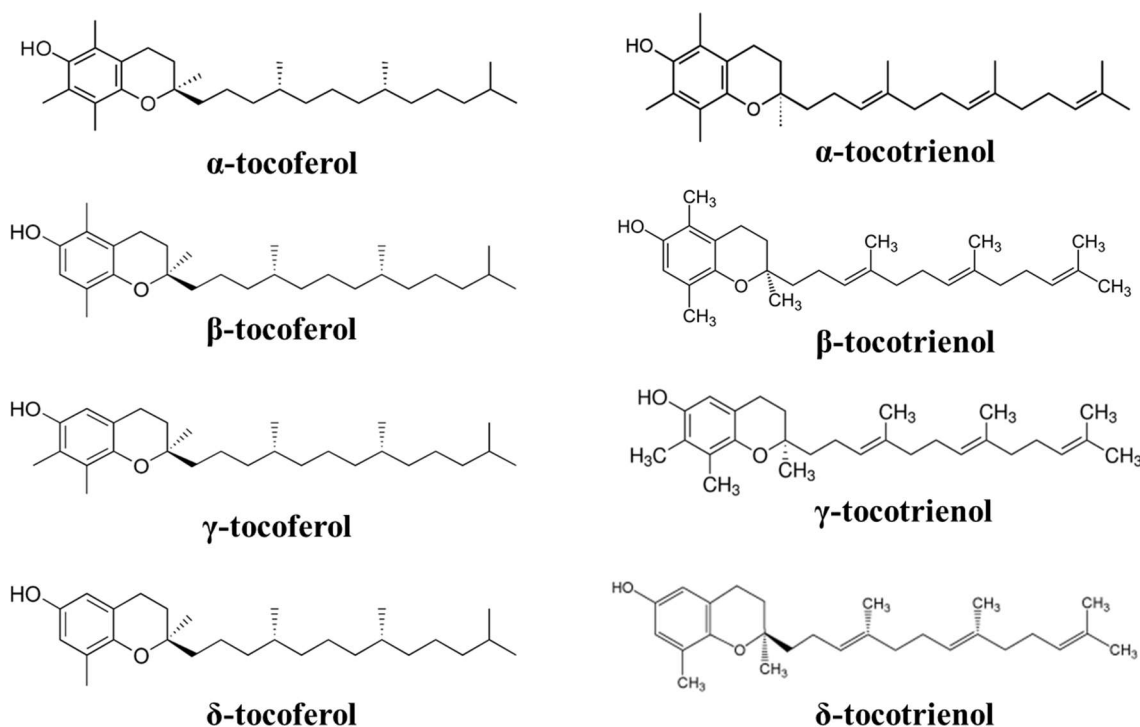


Figura 4. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.

Debido a su carácter lipófilo, los tocoferoles se encuentran en las membranas o en los lípidos de almacenamiento donde están disponibles de inmediato, reaccionando rápidamente de manera no enzimática (Traber y Sies, 1996; Christie, 2010). El mecanismo de acción antioxidante consiste en la interrupción de las etapas del proceso de autooxidación del organismo (Sayago *et al.*, 2007). Está bien establecido que algunas funciones de la vitamina E pueden tener una acción sinérgica con el selenio, así como el requerimiento de vitamina E se ve afectado por los aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina). Los tocoferoles y tocotrienoles protegen de la oxidación a los carotenos, retinol, biotina u otros sustratos oxidables en los alimentos. Sin embargo, su

acción antioxidante impide que sean biológicamente activos como fuente de vitamina E para otras funciones, como la integridad y función óptima de los sistemas reproductivo, muscular, circulatorio, nervioso e inmune de animales y humanos (McDowell, 2000; Debier y Larondelle, 2005). La presencia de vitamina C (ácido ascórbico) ahorra vitamina E en los tejidos, al regenerar el α -tocoferol a partir de sus productos de oxidación (Hatfield y Gladyshev, 2002).

5.2. Contenido en carotenoides y tocoferoles en el alimento del ganado ovino.

El ovino suele alimentarse principalmente con forrajes, frescos o conservados, y piensos compuestos. El contenido en carotenoides y tocoferoles depende en gran medida del tipo de alimento y de su conservación, además de otros factores.

5.2.1. Forrajes.

En los forrajes usados para rumiantes no se han encontrado más de 15 carotenoides a pesar de la gran variedad de estos compuestos presentes en las plantas. Los principales carotenos encontrados son α -caroteno, *trans*- β -caroteno y 13-*cis*- β -caroteno y las principales xantofilas son luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, anteraxantina y β -criptoxantina. La luteína, el todo-*trans*- β -caroteno, violaxantina y neoxantina son los más importantes cuantitativamente (Kalač, 2012; Álvarez *et al.*, 2015; Valdivielso *et al.*, 2015b). En cuanto a los tocoferoles, los forrajes presentan α -, β -, γ - y δ -tocoferol, siendo más abundante el α -tocoferol (Larsen *et al.*, 2012; Valdivielso *et al.*, 2015b).

Tanto factores propios del forraje como externos afectan a los contenidos de estos compuestos. Las diferentes familias, especies o variedades del forraje presentan diferencias en el contenido de carotenoides y tocoferoles (Kalač, 2012; Larsen *et al.*, 2012; Elgersma *et al.*, 2013). El avance del estado fenológico reduce el contenido de carotenoides y tocoferoles debido a la reducción de la proporción hojas:tallos (Williams *et al.*, 1998; Graulet *et al.*, 2012; Elgersma *et al.*, 2015), ya que las hojas contienen la mayor parte del contenido de carotenoides y tocoferoles en las plantas (Livingston *et al.*, 1968; Sayago *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2011). Las condiciones climáticas de producción del forraje (Lindqvist *et al.*, 2014), el momento del día (Kalač, 2012) o la fertilización nitrogenada (Park *et al.*, 1983; Egesel *et al.*, 2008) influyen en el contenido de dichos compuestos. La conservación y el almacenaje de los forrajes dan lugar a

pérdidas de estos compuestos (Ballet *et al.*, 2000; Rodríguez-Amaya, 2001), siendo la exposición a la radiación solar y al aire las principales causas (Nozière *et al.*, 2006; Beeckman *et al.*, 2010). El método de conservación puede influir en la pérdida de carotenoides y tocoferoles, siendo la henificación más perjudicial que en el ensilado (Nozière *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007; Lindqvist *et al.*, 2012).

5.2.2. Piensos compuestos.

La mayoría de los ingredientes usados para la fabricación de piensos compuestos tienen bajos contenidos en carotenoides, presentando luteína, zeaxantina o β -carotenos (Nozière *et al.*, 2006; Dunne *et al.*, 2009). El maíz contiene luteína y zeaxantina, así como pequeñas cantidades de otras xantofilas. Por otro lado, los subproductos de la industria del tomate o los cítricos pueden ser usados para la fabricación de piensos compuestos aportando compuestos carotenoides como el licopeno (Nozière *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015).

Sin embargo, muchos de los granos de cereal o semillas de oleaginosas usados para la fabricación de concentrados son buena fuente de vitamina E. Los granos de cereales varían en la composición del tocoferol según la especie. El trigo y la cebada contienen principalmente α -tocopherol, pero el maíz contiene, además cantidades apreciables de γ -tocopherol. Las semillas de oleaginosas también varían tanto en su contenido como en la distribución de los distintos tipos de tocoferoles, dependiendo de tipo de semilla (Ramírez y Quiles, 2005; Sayago *et al.*, 2007).

Carotenoides y tocoferoles se ven afectados por los procesos de fabricación de los piensos compuestos, como son la exposición a altas temperaturas, la molienda, la mezcla con minerales, la adición de grasa o la granulación (McDowell *et al.*, 1996). Dichos compuestos pueden seguir deteriorándose por oxidación durante su almacenamiento si no tienen suficientes antioxidantes. Todos estos factores pueden reducir parte de los contenidos iniciales presentes en los ingredientes (Nozière *et al.*, 2006; Dunne *et al.*, 2009).

5.3. Metabolismo de los carotenoides y tocoferoles en el ovino.

El metabolismo de los carotenoides difiere entre las especies de rumiantes (Yang *et al.*, 1992). Por ejemplo, los carotenos se descomponen en retinal antes de ser absorbidos por la mucosa intestinal en el ovino y caprino mientras que los carotenos pueden ser

absorbidos como tales en el intestino en el vacuno (Schweigert, 1998; McDowell, 2000). La actividad de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa en el intestino es mayor en ovino que vacuno o caprino (Yang y Tume (1993). También difiere entre especies de rumiantes el transporte de los carotenoides, retinol y tocoferoles, así como su deposición en los tejidos (Yang *et al.*, 1992; Darwish *et al.*, 2016). Por eso, se ha revisado el metabolismo en el ovino completando la información con artículos de otras especies de rumiantes cuando no se ha encontrado suficiente información.

5.3.1. Metabolismo ruminal y absorción.

El primer paso en la digestión de los carotenoides es la degradación de la matriz vegetal que libera estos compuestos en la fase líquida del rumen (Mora *et al.*, 1999). El grado de degradación de los carotenoides por parte de los microorganismos del rumen es incierto debido a la amplia gama de resultados, donde principalmente se estudia el β -caroteno tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Esta variación de resultados puede explicarse debido a la cantidad y a la fuente de carotenoides, ya que las tasas de degradación generalmente fueron mayores cuando los carotenoides se suministraron como productos purificados que cuando se proporcionaron en forrajes (Nozière *et al.*, 2006). Dawson y Hemington (1974) no observaron degradación del β -caroteno del forraje en ovejas, mientras que otros autores como Fernandez *et al.* (1976) encontraron una degradación baja (10–25%) de los carotenos en la oveja, o más alta (40-55%) como informaron King *et al.* (1962).

En el ovino, la absorción de los carotenoides se realiza preferentemente por los vasos linfáticos a través de micelas (Cardinault *et al.*, 2006; Nozière *et al.*, 2006). La absorción de los carotenoides es variable, absorbiéndose las xantofilas más fácilmente que los carotenos porque son más polares (Nozière *et al.*, 2006). Además, el tipo de isómero del carotenoide afecta la eficacia de la absorción, siendo la forma *trans* mejor absorbido que la forma *cis* (Stahl *et al.*, 1995). A su vez, la absorción depende de la administración y la dosis de carotenoides, así como del nivel de saturación (During *et al.*, 2005). Otros factores que afectan la eficacia de la absorción de los carotenoides son los componentes de la dieta, tales como el contenido y calidad de grasa, el contenido en fibra o la presencia de α -tocoferol (Blomhoff *et al.*, 1991).

Una vez los carotenoides son absorbidos, aquellos con actividad de provitamina A pueden procesarse más o menos eficientemente en numerosos tipos de células,

principalmente en enterocitos y hepatocitos, para producir dos moléculas de retinal por escisión oxidativa a través de la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (Borel *et al.*, 2005). El retinal se reduce a retinol por medio de una enzima reductasa, donde es absorbido por difusión facilitada en los enterocitos de la mucosa intestinal (Blomhoff y Blomhoff, 2006).

Al igual que los carotenoides, los tocoferoles deben salir fuera de la matriz vegetal como primer paso para ser liberados al líquido ruminal. Existen pocos estudios sobre la degradación ruminal de tocoferoles y generalmente se ha informado que estos compuestos son degradados en parte por la flora microbiana del rumen (McDowell *et al.*, 1996; Weiss, 1998). Sin embargo, estudios recientes donde se utilizan formas estabilizadas de la vitamina E (acetato de DL- α -tocoferilo) no han mostrado degradación ruminal (Hymøller y Jensen, 2010).

La absorción de los tocoferoles se lleva a cabo en combinación con la digestión y absorción de grasas y se facilita por sales biliares y las enzimas esterasa y lipasa pancreáticas (McDowell, 2000). La absorción de vitamina E por los enterocitos parece ocurrir por difusión pasiva, dependiendo principalmente de la cantidad y la calidad de la grasa en la dieta (Bjørneboe *et al.*, 1990; Bramley *et al.*, 2000). La mayor parte de la vitamina E se absorbe en los dos tercios superiores del intestino delgado, principalmente en forma de alcohol y en menor medida como ésteres. Éstos últimos se hidrolizan en la pared intestinal, mientras que el alcohol entra en los quilíferos intestinales y se transporta a través de la linfa a la circulación general (Traber y Arai, 1999). Los tocoferoles dietéticos más comunes son el α y γ -tocoferol y ambos parecen absorberse con la misma eficacia (Bramley *et al.*, 2000; Stahl *et al.*, 2002). A medida que la ingestión de vitamina E aumenta por causa de una suplementación, baja la absorción de α -tocoferol lo que sugiere un proceso de saturación (McDowell, 2000). En la mayoría de las especies, incluidos los rumiantes, la absorción de estos compuestos es proporcional a los requerimientos del animal, absorbiéndose mayor cantidad cuando hay deficiencias (Hidiroglou *et al.*, 1992; Scherf *et al.*, 1996; Traber y Sies, 1996). La presencia de vitamina A puede interferir en la absorción y biodisponibilidad de la vitamina E en sus diferentes formas debido a que la vitamina A en la dieta también podría antagonizar la absorción intestinal de la vitamina E (Combs, 1976) al competir el retinol con el α -tocoferol por las mismas enzimas o mecanismos de captación celular (Eicher *et al.*, 1994).

5.3.2. Transporte y depósito.

Los carotenoides por su naturaleza liposoluble son transportados en el plasma asociados a una proteína específica (Blomhoff y Kiil, 2006). El tipo de proteínas que las transportan varía según la especie de rumiante. En este sentido, Yang *et al.* (1992) establecieron que los carotenoides en el plasma bovino se distribuyen aproximadamente proporcionalmente en lipoproteínas de muy baja densidad, baja de densidad o alta densidad (por sus siglas en inglés: VLDL, LDL y HDL respectivamente), mientras que en pequeños ruminantes se encuentran principalmente en VLDL + LDL (67,3% en ovejas y 57,7% en cabras) a pesar de la mayor proporción de HDL en el plasma. Carotenoides, como la luteína y el β -caroteno son transportados en el plasma (Nozière *et al.*, 2006) y se acumulan principalmente en tejidos como la grasa, el músculo o el hígado (Yang *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 2015). El retinol se transporta asociado a LDL depositándose principalmente en los hepatocitos y en las células estrelladas y parenquimatosas del hígado (Debier *et al.*, 2005). Durante el transporte, una parte puede quedar retenida en tejidos extra-hepáticos tales como los pulmones, los riñones, el bazo, músculo esquelético, tejido adiposo y la médula ósea, mientras el resto llega al hígado donde seguirá el metabolismo del retinol (Blomhoff *et al.*, 1991; Blaner *et al.*, 1994; Blomhoff y Blomhoff, 2006). Dependiendo de la especie rumiante pueden variar las cantidades de carotenoides o de vitamina A acumulados y los lugares principales de depósito (Yang *et al.*, 1992; Darwish *et al.*, 2016). De hecho, en ovino se ha observado la presencia de retinol y luteína en el tejido adiposo, hígado y músculo y de β -caroteno en estos dos últimos tejidos, siendo el retinol el compuesto con mayor concentración seguido de la luteína en los diferentes tejidos (Yang *et al.*, 1992; Darwish *et al.*, 2016; Bertolín *et al.*, 2018).

Los tocoferoles no tienen una proteína específica de transporte y circulan unidos a las lipoproteínas del plasma, se hidrolizan parcialmente y se absorben principalmente el hígado. Desde el hígado, el α -tocoferol se exporta en combinación con VLDL a otros tejidos y órganos del cuerpo (Debier y Larondelle, 2005), almacenándose principalmente en el tejido hepático que junto con el tejido adiposo y con el músculo esquelético suman aproximadamente el 90% del total de α -tocoferol almacenado (Bjørneboe *et al.*, 1990). El depósito se produce de forma muy rápida en el hígado, pulmón, bazo, riñón y eritrocitos, mientras que se realiza a velocidades muy lentas en el tejido cerebral y adiposo (Debier y Larondelle, 2005). En general, el α -tocoferol se disemina a los tejidos

corporales por acción masiva y en proporción a la ingesta. Se requiere una ingesta continua de α -tocoferol para mantener las concentraciones de esta vitamina en las membranas celulares de todo el cuerpo (McDowell *et al.*, 1996; Weiss, 1998). Al igual que la absorción, el transporte del γ -tocoferol es similar al del α -tocoferol. Sin embargo, presenta una menor concentración y depósito en los tejidos debido a la discriminación que se produce entre las dos formas a nivel hepático (Debier y Larondelle, 2005). Esto hace que sea difícil la modificación de su concentración en los tejidos a través de la dieta. El γ -tocoferol ha sido detectado en el tejido graso, músculo e hígado del ganado ovino, presentando niveles más bajos que el α -tocoferol (Osorio *et al.*, 2008; Rozbicka-Wieczorek *et al.*, 2016; Bertolín *et al.*, 2018).

5.4. Presencia de carotenoides y vitaminas liposolubles (A y E) en los fluidos y tejidos de los animales.

Como se ha comentado anteriormente, el transporte y depósito de estos compuestos a través de diferentes fluidos y tejidos es distinto según el tipo de compuesto y de la dieta recibida. Con lo cual su determinación y cuantificación en diferentes matrices biológicas es una importante herramienta para estudiar la trazabilidad de estos productos animales.

5.4.1. Plasma.

La presencia de carotenoides y retinol en el plasma de ovino ha sido observado en diferentes estudios (Yang *et al.*, 1992; Nozière *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015). La mayoría de los estudios realizados en ovinos expresaron los resultados como concentración de carotenoides en el plasma, suponiendo que el único carotenoide circulante en estos animales es la luteína (Prache *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2012; Zawadzki *et al.*, 2013). Sin embargo, también se han detectado zeaxantina y más ocasionalmente β -caroteno en corderos criados a base pasto fresco (Prache *et al.*, 2003b; Cardinault *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2014). En cuanto al retinol, se ha detectado tanto en plasma de ovinos adultos alimentados en régimen de pastoreo (Yang *et al.*, 1992), como en corderos lechales y en corderos ligeros cebados en extensivo o en intensivo (Álvarez *et al.*, 2014).

Dian *et al.* (2007a) observaron una mayor concentración de carotenoides totales en el plasma medidos en el momento del sacrificio (33 kg peso vivo (PV)) en los corderos

alimentados a base de pasto fresco que cuando se alimentaron a base de concentrado, discriminando correctamente la alimentación recibida por los corderos en el 91% de las muestras de suero. Dian *et al.* (2007b) informaron que un mayor aporte alfalfa deshidratada en la dieta de corderos durante 60 días, aumentó la concentración de carotenoides en el plasma. Lo mismo ocurrió en un estudio llevado a cabo por Prache *et al.* (2003a), donde los corderos criados en pastoreo presentaron mayor concentración de carotenoides que aquellos corderos que en parte o la totalidad de su cebo se hizo con concentrado. Sin embargo, Prache *et al.* (2009) no mostraron diferencias en el contenido de carotenoides en el plasma cuando los corderos fueron alimentados en pastoreo frente a la alimentación a base de alfalfa deshidratada y paja. La aparición de carotenoides en el plasma por la dieta es rápida (24 h) y tiene cortos periodos de latencia, incrementándose linealmente con la ingesta diaria según afirmó De Oliveira *et al.* (2012) cuando alimentaron corderos con alfalfa deshidratada, que previamente habían recibido una dieta baja en carotenoides.

El efecto de la administración externa de vitamina A sobre el contenido de retinol en plasma puede variar dependiendo tanto del metabolismo del animal como de la forma de administración. En este sentido, Arnett *et al.* (2007) observaron que el aporte de concentrado con una suplementación de 6.600 mg/kg concentrado de vitamina A en corderos no afectó a su contenido en plasma durante los primeros 56 días, pero si a los 84 días. Mientras que un incremento de retinol en plasma se vio reflejado al día siguiente de la administración por vía parenteral de vitamina A (3500 mg/kg PV) a ovejas en lactación (Koutsoumpas *et al.*, 2013). Los cambios sobre los niveles séricos de retinol pueden retrasarse e incluso su concentración a veces aumenta cuando se eliminan las fuentes de vitamina A en la dieta y se movilizan las reservas hepáticas. Por lo tanto, los niveles de la vitamina A en el plasma tienden a mantenerse durante más tiempo en los animales con mayores reservas de vitamina A hepática. Dichas reservas, generalmente, son mayores en los animales con alto consumo de vitamina A o en animales más viejos que pueden haber acumulado mayores reservas (Arnett *et al.*, 2007)

Existen diversos estudios respecto a los efectos de la dieta sobre los niveles de vitamina E en el plasma del ganado ovino, los cuales se basan únicamente en el análisis del α -tocoferol. Dicho compuesto se ha detectado tanto en el plasma ovinos adultos (Ochoa *et al.*, 1992; Pearce *et al.*, 2005) como en corderos (Álvarez *et al.*, 2014; González-Calvo *et al.*, 2015; Luciano *et al.*, 2017). El contenido de vitamina E en el en

el plasma depende de la aportación dietética y aumenta con la prolongación de este aporte (Guidera *et al.*, 1997). Generalmente, su punto de saturación tiene lugar en torno a los 11-14 días de ingesta (Lee *et al.*, 2007a; González-Calvo *et al.*, 2015), pero dicho periodo puede variar según la cantidad de vitamina que se ingiere, los ingredientes y la cantidad de dieta consumida (Kasapidou *et al.*, 2009). Luciano *et al.* (2017) observaron un incremento del 60% del contenido de α -tocoferol en el plasma de corderos alimentados con una dieta compuesta con 35% pulpa de cítricos frente a los corderos que recibieron una dieta control. Pearce *et al.* (2005) observaron que las ovejas que pastorearon *Atriplex* spp. presentaron un incremento del 50% de la concentración de α -tocoferol en el plasma respecto a ovejas que recibieron una dieta de pasto seco. La suplementación en corderos de un concentrado que contiene 500 mg/kg de acetato de α -tocoferilo incrementó el contenido de α -tocoferol en plasma respecto a los corderos alimentados con una dieta control (González-Calvo *et al.*, 2015). Sterndale *et al.* (2018) informaron de que la suplementación oral de α -tocoferol y selenio en ovejas preñadas, incrementó la concentración del α -tocoferol en el plasma de la oveja en el momento del parto y en el plasma del cordero al nacimiento y a las 4 semanas de edad respecto al grupo control. Mientras que la administración de α -tocoferol en una dosis de 9 frente a 4,5 mg/kg PV por vía parenteral en ovejas un mes antes del parto llevó a una mayor concentración de α -tocoferol en el plasma de los corderos al nacimiento, pero no en el suero de las ovejas (Cuesta *et al.*, 1995). Tanto la fuente de α -tocoferol como la vía de administración tienen influencia en la concentración de α -tocoferol en el plasma del ganado ovino (Judson *et al.*, 1991; Hidiroglou *et al.*, 1992). La administración de dietas deficientes en vitamina E produce la disminución de la concentración de α -tocoferol en plasma, dicha concentración varía en función de las reservas de α -tocoferol acumuladas fundamentalmente en hígado (Fry *et al.*, 1993).

Álvarez *et al.* (2014) realizaron un estudio con corderos donde analizan conjuntamente carotenoides y vitaminas solubles en el plasma. Para ello usaron tres grupos de corderos, uno con fase de cebo en pastoreo, otro con fase de cebo a base de concentrado y un último grupo de corderos en lactación con sus madres en pastoreo. En dicho estudio, los carotenoides (luteína y β -caroteno) solo se detectaron en los corderos con cebo en pastoreo y el retinol fue más alto en los corderos con cebo de concentrado que en los otros dos grupos. El α -tocoferol presentó un contenido mayor en los corderos en pastoreo que en los que estaban en lactación, presentando los corderos alimentados

con concentrado un contenido similar a los grupos anteriores. Los autores anteriores indicaron que el contenido de las vitaminas liposolubles puede verse afectados por el contenido en vitamina E del concentrado usado en la alimentación antes del inicio de este ensayo. También puede influir la interacción entre la vitamina E (α -tocoferol) y la vitamina A (retinol) ya que, en rumiantes, las altas concentraciones de uno parecen reducir las concentraciones plasmáticas o tisulares del otro por fenómenos de competencia en el proceso de absorción y transporte. En este sentido una alta concentración α -tocoferol puede interferir en la absorción y el metabolismo (es decir, su conversión a retinol) del β -caroteno (Yang *et al.*, 2002) o viceversa (Asadian y Mézes, 1996; Koutsoumpas *et al.*, 2013).

5.4.2. Leche.

La vitamina A y E son muy importantes para la supervivencia del recién nacido y la alimentación materna es fundamental para asegurar su aporte a los neonatos (McDowell *et al.*, 1996; Dønnem *et al.*, 2015). Sin embargo, los recién nacidos contienen bajos niveles de β -caroteno, retinol y α -tocoferol en sus tejidos y el plasma sanguíneo, debido a una transferencia placentaria muy limitada (Njeru *et al.*, 1994; Berzal *et al.*, 2015; Sterndale *et al.*, 2018). Por lo que su ingestión a través del calostro y la leche es fundamental para contribuir a una mejora de las defensas y de unas funciones metabólicas adecuadas de los recién nacidos (Blum *et al.*, 1997; Debier y Larondelle, 2005). Además, diversos estudios han mostrado que los carotenoides y las vitaminas liposolubles presentes en la leche pueden ser reflejados en diferentes tejidos de los corderos lactantes (Osorio *et al.*, 2008; D'Alessandro *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2015). Por lo tanto, resulta interesante el estudio de estos compuestos en la leche debido a que a través de la lactación se incorporan a los tejidos de los corderos, diferenciándose su concentración según la composición la leche y la dieta la oveja. Entre los diversos factores que afectan a la concentración de esos compuestos en la leche como son la raza, la estación del año, en número de partos y el propio individuo, también influye la dieta (Shingfield *et al.*, 2005; Nozière *et al.*, 2006).

La leche de la oveja presenta luteína y retinol pero no β -caroteno (Nozière *et al.*, 2006; Gentili *et al.*, 2012; Bertolín *et al.*, 2018). Las cabras y ovejas presentan una mayor conversión enzimática del β -caroteno en retinol que las vacas, reduciendo la presencia del β -caroteno libre (Álvarez *et al.*, 2015). Valdivielso *et al.* (2015a) no encontraron

efecto sobre el contenido de retinol en la leche de oveja comparando un sistema de alimentación basada en el pastoreo frente a un régimen de concentrado.

En cuanto a los tocoferoles, la leche de oveja presenta las formas α y γ , así como otros compuestos con actividad de vitamina E (tocotrienoles) (Gentili *et al.*, 2012; Valdivielso *et al.*, 2015a). Un sistema de alimentación basado en pastoreo frente a la alimentación intensiva aumentó las concentraciones de α -tocoferol, pero redujo la concentración de γ -tocoferol (Valdivielso *et al.*, 2015a). La suplementación con vitamina E también puede incrementar su contenido en la leche. En este sentido, Gallardo *et al.* (2015) observaron un incremento de la vitamina E en la leche de ovejas suplementadas con 400 mg/kg de vitamina E en un concentrado respecto a una dieta control sin suplementación, siendo el incremento mayor cuando la vitamina E fue natural frente a la sintética. Sterndale *et al.* (2018a) informaron de que la administración oral de α -tocoferol y selenio en ovejas preñadas provocó una mayor concentración de α -tocoferol en el calostro respecto a las ovejas que no fueron suplementadas. Mientras que Cuesta *et al.* (1995) no encontraron diferencias en la concentración de α -tocoferol en leche cuando administraron dos niveles de diferentes de vitamina.

5.4.3. Hígado.

El hígado es el principal órgano donde se depositan los carotenoides y el retinol. Además, desempeña un papel fundamental en la conversión del β -caroteno a vitamina A y su distribución a otros tejidos a través de lipoproteínas hepáticas (Nozière *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015). Anteriores estudios han informado de la presencia de β -caroteno y retinol en el hígado de ovejas adultas, pero no se ha detectado o analizado la presencia de luteína (Yang *et al.*, 1992; Darwish *et al.*, 2016). Sin embargo, Bertolín *et al.* (2018) observaron, además del retinol, la presencia de luteína en el hígado de corderos lechales cuyas madres se alimentaron en pastos de montaña.

Hasta el momento, no hay comparaciones de los contenidos de carotenoides y retinol en el hígado de ganado ovino según la dieta, pero se ha estudiado el efecto de la suplementación de vitamina A sobre el contenido de retinol en el hígado (Donoghue *et al.*, 1983; Asadian y Mézes, 1996). La suplementación con diferentes cantidades de vitamina A incrementó el retinol hepático en ovejas de cola grasa, existiendo diferente respuesta a esta suplementación entre las dos razas usadas (Asadian y Mézes, 1996). Sin embargo, la suplementación con cantidades muy superiores (9000 y 18000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PV) de

retinol respecto a una dieta control (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PV) no mostraron cambios en su contenido en el hígado de corderos, pero sí en los ésteres de retinilo, que es la primera forma de almacenamiento de la vitamina A en el hígado (Donoghue *et al.*, 1983). En vacuno, el contenido de retinol y β -caroteno en el hígado fue superior en los animales criados en régimen de pastoreo frente a los que se alimentaron a base de concentrado (Simonne *et al.*, 1996; Darwish *et al.*, 2016).

En el caso de los tocoferoles, el hígado es uno de los principales órganos de reservorio en los rumiantes (Ochoa *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2002; Kasapidou *et al.*, 2009). La mayoría de los estudios sobre vitamina E en el hígado del ganado ovino se basan fundamentalmente en el análisis del α -tocoferol (Pearce *et al.*, 2005; Kasapidou *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2017). Recientemente, han aparecido estudios donde además del α -tocoferol, han determinado el γ - y δ -tocoferol en el hígado de corderos (Rozbicka-Wieczorek *et al.*, 2016; Bertolín *et al.*, 2018).

Respecto a la influencia de la dieta, Luciano *et al.* (2017) observaron que los corderos alimentados con un 35% de pulpa de cítricos presentaron un contenido mayor de α -tocoferol en el hígado que aquellos alimentados con la dieta control, debido al alto contenido de α -tocoferol en la pulpa de los cítricos. En el mismo sentido, Pearce *et al.* (2005) encontraron un mayor contenido de α -tocoferol en el hígado de ovejas alimentadas con *Atriplex* spp. rico en α -tocoferol, frente a ovejas alimentadas con rastrojo de cebada y heno. Kasapidou *et al.* (2009) afirmó que los corderos alimentados a base de ensilado de hierba con 500 mg/kg MS de acetato de α -tocoferilo presentaron mayor contenido de α -tocoferol que aquellos alimentados a base de un concentrado enriquecido con 500 mg/kg MS de acetato de α -tocoferilo. Fry *et al.* (1993) observaron una rápida bajada de la concentración de α -tocoferol en el hígado en corderos con una dieta deficiente en vitamina E debido a su importante papel en la regulación de los niveles de este compuesto en otros tejidos (Hidiroglou, 1987). En vacuno, se ha registrado un mayor contenido de α -tocoferol en el hígado de animales alimentados a base de pasto que en aquellos alimentados con concentrado (Yang *et al.*, 2002). Igualmente, un incremento del contenido α -tocoferol en el hígado puede tener lugar cuando se produce la suplementación con diferentes fuentes de vitamina E sobre la dieta que reciben los animales (Judson *et al.*, 1991; Asadian y Mézes, 1996; Kasapidou *et al.*, 2009).

5.4.4. Músculo.

El interés del estudio de los carotenoides y vitaminas liposolubles en el músculo tiene fundamentalmente dos razones. Por un lado, su actividad antioxidante permite incrementar la vida útil de la carne (Descalzo *et al.*, 2005; Kasapidou *et al.*, 2012; Ripoll *et al.*, 2013). Por otro lado, aunque el contenido de vitaminas liposolubles sea más bajo que en otros tejidos (Ochoa *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2002; Kasapidou *et al.*, 2009), el músculo constituye el principal componente de la canal consumido por la población, por lo que puede considerarse como fuente de parte de las vitaminas liposolubles disponible para los humanos (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013; Darwish *et al.*, 2016).

La mayor parte de los estudios utilizan el músculo *longissimus dorsi* (Ponnampalam *et al.*, 2012; Gallardo *et al.*, 2015; Ponnampalam *et al.*, 2016; Luciano *et al.*, 2017), mientras una menor parte usan músculos como el *semimembranosus*, *semitendinosus* o *gluteus medius* (Kasapidou *et al.*, 2009; D'Alessandro *et al.*, 2012; Kasapidou *et al.*, 2012). Pueden existir diferencias de contenido de estos compuestos cuando se comparan dos músculos. Osorio *et al.* (2008) encontraron más retinol y menos α -tocoferol en el músculo de la pierna que en músculo *longissimus dorsi thoracis* de corderos lechales. En vacuno, Gobert *et al.* (2010) encontraron más retinol en el músculo *longissimus dorsi thoracis* que en el músculo *semitendinosus* y Yang *et al.* (2002) observaron que el *gluteus medius* tendía a presentar mayores contenidos de α -tocoferol y β -caroteno que *longissimus dorsi* y *semimembranosus*. Estas diferencias podrían estar ligadas al número de mitocondrias presentes en el músculo, ya que es el orgánulo de almacenamiento de α -tocoferol en las células musculares (den Hertog-Meischke *et al.*, 1997), así como a un diferente contenido en grasa intramuscular ya que estos compuestos son liposolubles.

Existen pocos estudios sobre el contenido de carotenoides y retinol en el músculo de ganado ovino, ya sean corderos o adultos. Darwish *et al.* (2016) determinaron retinol y β -caroteno sobre *longissimus dorsi* de ovejas alimentadas a base de forraje fresco. Bertolín *et al.* (2018) observaron la presencia de luteína, además de retinol, en el *longissimus dorsi* de corderos lechales cuyas madres estaban en régimen de pastoreo. Osorio *et al.* (2008) mostraron un incremento del contenido de retinol en el *longissimus dorsi* y en la musculatura de la pierna de aquellos corderos que recibieron leche enriquecida con retinol y tocoferoles frente a corderos que recibieron leche materna.

Valenti *et al.* (2018) observaron mayor contenido de retinol en el *longissimus dorsi* de corderos alimentados con una dieta suplementada con tomate deshidratado frente una dieta control, debido al alto contenido en licopeno y β -caroteno del tomate. En vacuno, Yang *et al.* (2002) observaron que la suplementación con α -tocoferol redujo la deposición del β -caroteno en los músculos de los animales en pastoreo, pero no modifica la deposición de β -caroteno en los animales alimentados con concentrado. Aun así, las cantidades depositadas fueron siempre superiores en el grupo de los animales en pastoreo que en los de concentrado. Condron *et al.* (2014) observaron que el aporte en la dieta de diferentes niveles de β -caroteno incrementó los niveles de todo-*trans*- β -caroteno pero no los de retinol en el músculo *longissimus dorsi* de terneros.

El contenido de α -tocoferol en el músculo depende de la dieta, como así lo demuestran varios estudios mientras que el contenido en γ -tocoferol es más difícil de modificar. El α -, γ - y δ -tocoferol en el músculo *longissimus dorsi* y en la musculatura de la pierna de corderos lechales respondió al contenido en leche de dichos analitos (Osorio *et al.*, 2008). Ponnampalam *et al.* (2012) concluyeron que los corderos alimentados con pasto perenne presentaron mayor contenido de α -tocoferol en el músculo *longissimus thoracis et lumborum* que los que se alimentaron con una dieta basada en pasto anual, el cual presentaba unos niveles menores de α -tocoferol que el pasto perenne. D'Alessandro *et al.* (2012) observaron que los corderos lechales cuyas madres fueron alimentadas con pasto fresco presentaban un mayor contenido de α -tocoferol en el músculo *semimembranosus* que aquellos cuyas madres fueron alimentadas con heno y concentrado. Los corderos alimentados con una dieta que incluía un 35% de pulpa de cítricos presentaron un mayor contenido de α -tocoferol en el músculo *longissimus dorsi* respecto a los corderos que recibieron una dieta control (Luciano *et al.*, 2017). Pearce *et al.* (2005) mostraron que el pastoreo de *Atriplex* spp. frente a una alimentación basada en pasto seco mejora el contenido de α -tocoferol en el músculo *longissimus dorsi*. Igualmente, el aporte de vitamina E en forma de acetato de α -tocoferilo como suplemento de la dieta aumenta los contenidos de α -tocoferol dependiendo de la dosis (Kasapidou *et al.*, 2012) y de la duración del periodo de suplementación (Ripoll *et al.*, 2013; González-Calvo *et al.*, 2015). En cambio, Valenti *et al.* (2018) encontraron un incremento de contenido del γ -tocoferol respecto a la dieta control cuando administraron a corderos una dieta suplementada con tomate, rica en α - y γ -tocoferol. En cambio, el α -tocoferol no se

incrementó debido, probablemente, a la interacción del alto contenido en licopeno y β -caroteno del tomate con el α -tocoferol.

Aparte de usar el propio contenido en α -tocoferol en el músculo para poder diferenciar la dieta recibida por los animales, Röhrle *et al.* (2011) proponen el uso de los estero-isómeros para diferenciar la fuente de la que proviene el α -tocoferol. Dichos autores afirman que los forrajes presentan fundamentalmente el esteroisómero RRR, mientras que en los concentrado o correctores vitamínicos predominan esteroisómeros como SSS. De manera que el estudio de los esteroisómeros de α -tocoferol en el *longissimus dorsi* puede ser usado para diferenciar la dieta recibida por los animales.

5.4.5. Tejido adiposo.

El análisis de los carotenoides y vitaminas liposolubles se realiza fundamentalmente en la grasa perirrenal o la caudal subcutánea. El depósito de estos compuestos varía según la localización del tejido adiposo siendo mayor en la grasa perirrenal que en la subcutánea (Priolo *et al.*, 2002; Zawadzki *et al.*, 2013). Esto se debe a las diferencias de precocidad en el desarrollo del tejido graso cuando se estudian animales relativamente jóvenes, siendo más precoz el perirrenal, seguido de tejido omental, el intramuscular y por último, el subcutáneo (Vernon, 1986; Arana *et al.*, 1998). Estas diferencias entre tejidos deberían ser tenidas en cuenta a la hora de rastrear el tipo de alimentación recibida por el animal en base a su edad y desarrollo.

Prache *et al.* (2003b) determinaron luteína en la grasa perirrenal de corderos, donde los animales alimentados a base de pasto presentaron tres veces más contenido de luteína que los criados con concentrado, aunque no fue significativamente diferente. Por otro lado, Álvarez *et al.* (2014) informaron que los corderos ligeros cebados en pastoreo presentaron un mayor contenido de retinol en la grasa perirrenal que aquellos cebados a base de concentrado. La luteína, junto con el retinol, también se detectaron en la grasa subcutánea de carneros castrados alimentados con pasto, pero no el β -caroteno (Yang *et al.*, 1992). Algunos estudios indican que un aporte de vitamina A en el concentrado puede dar lugar a una reducción del contenido en retinol, lo cual puede ser debido a un aumento en el depósito de grasa inducido por la suplementación de vitamina A, que diluye el contenido total de retinol (Asadian y Mézes, 1996; Arnett *et al.*, 2007). Priolo *et al.* (2002) propusieron el uso del espectro de reflectancia como método para trazar la alimentación recibida por los corderos basándose en el depósito de carotenoides en la grasa de la canal.

Esta metodología permitió clasificar el sistema de alimentación a través grasa perirrenal y caudal de corderos con un alto acierto (90-95%), discriminando la alimentación basada en el pastoreo frente a la de un régimen intensivo (Dian *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando la alimentación se basó en dos forrajes diferentes este tipo de herramienta tiene mayor dificultad para discriminar entre ambos forrajes a partir del estudio los tejidos adiposos (Prache *et al.*, 2009)

El tejido adiposo constituye uno de los principales tejidos de depósito del α -tocoferol ingerido a través de la dieta (Ochoa *et al.*, 1992; Kasapidou *et al.*, 2009). Tanto α - como γ -tocoferol han sido detectados en la grasa subcutánea y perirrenal de corderos (Judson *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2007b; Bertolín *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre el contenido en vitamina E se basan en el análisis del α -tocoferol, ya que es la isoforma de tocoferol con mayor actividad (McDonald *et al.*, 2011). El α - y γ -tocoferol tienen una absorción similar pero el α -tocoferol tiene una gran afinidad por la proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP), que facilita la transferencia entre membranas, mientras que el γ -tocoferol tiene baja afinidad por ella. A través de esta proteína parece que el hígado discrimina entre el α - y γ -tocoferol. Esto hace que sea difícil modificar la deposición γ -tocoferol a través de la dieta (Debier y Larondelle, 2005). Álvarez *et al.* (2014) obtuvieron mayor concentración de α -tocoferol en la grasa perirrenal de los corderos criados en pastoreo frente a los que se criaron con concentrado. Ochoa *et al.* (1992) observaron como el contenido en α -tocoferol en el tejido adiposo de corderos castrados varía según la forma de presentación del α -tocoferol con el que fue suplementada la dieta. Kasapidou *et al.* (2009) observaron que la inclusión de diferentes niveles de acetato de α -tocoferol en una dieta basada en concentrado conllevó al aumento del α -tocoferol en la grasa subcutánea de cordero. En vacuno, Yang *et al.* (1992) informaron que la alimentación con pasto produjo mayor depósito de α -tocoferol en la grasa subcutánea que una dieta de concentrado basada en sorgo.

5.5. Influencia de los taninos condensados sobre la concentración de las vitaminas liposolubles.

Los taninos condensados presentes en las plantas o aportados como suplemento podrían tener un efecto protector sobre los carotenoides y tocoferoles en el plasma o en los tejidos del animal. Estos compuestos polifenólicos están presentes en contenidos moderados en la esparceta, uno de los forrajes usados para los ensayos de esta Tesis. Por

lo tanto, resulta interesante tener en cuenta la posible interacción de los taninos condensados sobre los contenidos en carotenoides, tocoferol y retinol en los distintos fluidos o tejidos animales dada su capacidad antioxidante (ver Lobón *et al.* (2017a) y Lobón *et al.* (2019b)). Para que los TC u otros compuestos polifenólicos ejerzan dicho efecto protector se deben absorber tal cual o a través de sus metabolitos. En este sentido, se han detectado compuestos fenólicos o sus metabolitos en los tejidos de rumiantes alimentados con alguna fuente rica en compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (Gladine *et al.*, 2007; Moñino *et al.*, 2008). En este sentido, se han encontrado metabolitos de los TC de la esparceta en el rumen, abomaso e intestino delgado de corderos (Quijada *et al.*, 2018). Sin embargo, la bibliografía en general muestra que los compuestos fenólicos no se detectan en los tejidos cuando los animales se alimentan con fuentes de TC y que hay una casi nula degradación en el rumen y absorción intestinal de estos compuestos (Makkar, 2003a; López-Andrés *et al.*, 2013). Diversos autores indican que compuestos fenólicos del quebracho (López-Andrés *et al.*, 2013) o de *Lolium perenne* (López-Andrés *et al.*, 2014) mejoran el estado antioxidante, aunque estos compuestos no sean detectados. Dicha mejora podría deberse a la actividad antioxidante indirecta de los TC en el tracto gastrointestinal, como la quelación de compuestos prooxidantes o la reducción de la peroxidación lipídica (Halliwell *et al.*, 2005; Kerem *et al.*, 2006).

Esta acción antioxidante de los taninos condensados podrían proteger y aumentar los contenidos de carotenoides y tocoferoles en los distintos tejidos mediante tres mecanismos. Por un lado, la presencia de taninos condensados en el aparato digestivo disminuye la oxidación de los carotenoides y α -tocoferol en el aparato digestivo, permitiendo una mayor absorción y circulación plasmática de estos compuestos (Gorelik *et al.*, 2005; Shabtay *et al.*, 2008). Por otro lado, estos compuestos polifenólicos pueden proteger de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad encargadas del transporte de las vitaminas liposolubles (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Por último, los taninos condensados pueden proteger directamente a las vitaminas liposolubles circulantes y presentes en los tejidos (Gorelik *et al.*, 2005; Pazos *et al.*, 2009; Iglesias *et al.*, 2012), así como potenciar su actividad (Craig, 1997). Sin embargo, la mayoría de los estudios que evaluaron los efectos antioxidantes de la inclusión en la dieta de TC no informaron la concentración de carotenoides, tocoferoles ni retinol en el plasma o los tejidos animales.

La mayoría de los estudios que combinan el efecto de los TC y reportan datos sobre los carotenoides y las vitaminas liposolubles en diferentes fluidos o tejidos, lo hacen

principalmente atendiendo a los tocoferoles. En el plasma, Shabtay *et al.* (2008) informaron del aumento en contenido de α -tocoferol en terneros alimentados con un aporte de cáscaras de granada, rica en TC, frente a los terneros alimentados con concentrado. En humanos, las catequinas (compuesto polifenólico) reducen el agotamiento en el plasma del α -tocoferol y el β -caroteno (Lotito y Fraga, 2000). Li *et al.* (2013) observaron una protección de las proantocianidinas sobre el α -tocoferol circulante en el plasma de humanos. Recientemente, se ha encontrado que la inclusión de TC de quebracho en la dieta de ovejas en lactación incrementó la concentración de α -tocoferol en la leche y, en consecuencia, en la carne de cordero lechal (Lobón *et al.*, 2017c). Esto concuerda con que la adición de catequinas protege de la degradación al retinol y α -tocoferol de la leche (Jung, 2011). Algunos estudios han mostrado un mejor estado antioxidante en el hígado de corderos que recibieron en su dieta compuestos fenólicos de quebracho o de *Lolium perenne*, debido probablemente a la protección de compuestos como los tocoferoles, aunque su contenido no fue determinado (López-Andrés *et al.*, 2013; López-Andrés *et al.*, 2014). En este sentido, Goñi *et al.* (2007) encontraron un mayor contenido de α -tocoferol en el hígado de pollos cuya dieta fue suplementada con orujo de uva. La inclusión de residuos de destilación de romero, que contienen TC, en la dieta de los corderos aumentó la deposición de α -tocoferol en el músculo y redujo la de γ -tocoferol (Yagoubi *et al.*, 2018). En este sentido, Valenti *et al.* (2019) observaron que la inclusión en la dieta de taninos de tara (*Caesalpinia spinosa*) provocan un ligero incremento del α -tocoferol y una reducción del γ -tocoferol en el músculo de corderos, sin que haya efecto sobre la concentración del δ -tocoferol. En terneros, la inclusión de taninos condensados con el sorgo tampoco modificó la cantidad de α -tocoferol el músculo *longissimus dorsi lumborum*, pero redujo la concentración de γ -tocoferol (Larraín *et al.*, 2008). Como en el ensayo anterior, una dieta con extracto de uva, rica en TC, no modificó la concentración de α -tocoferol en el músculo *longissimus dorsi* de corderos cuando se comparó con la dieta control (Muñío *et al.*, 2014).

II. Objetivos

La presente Tesis Doctoral se planteó con el objetivo general de valorar la influencia de diferentes dietas del ovino en el área mediterránea sobre los parámetros de la fermentación ruminal y la deposición de compuestos secundarios como los carotenoides y tocoferoles en los tejidos del cordero.

Para abordar dicho objetivo general, se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1. Comparar los parámetros de la fermentación *in vitro* según la inclusión de un concentrado con o sin taninos condensados de quebracho en dietas forrajeras de distinta calidad usadas en la alimentación de ovejas en lactación.

2. Estudiar el efecto del tipo de leguminosa (alfalfa y esparceta), de los taninos condensados y del estado fenológico sobre los parámetros de la fermentación *in vitro*.

3. Determinar el efecto de la conservación sobre los parámetros de la fermentación *in vitro* de la esparceta y zulla, leguminosas con contenido medio-alto de taninos condensados.

4. Cuantificar los carotenoides y vitaminas liposolubles en el plasma y los tejidos del cordero ligero según el sistema de alimentación de la madre durante la lactación y evaluar su uso como herramienta de trazabilidad del sistema de alimentación.

III. Material y Métodos

Para la consecución de los objetivos de la presente Tesis Doctoral se plantearon cuatro ensayos, tres de los cuales estudian el efecto de diferentes factores de las dietas del ganado ovino en el área mediterránea sobre la fermentación *in vitro* y el cuarto ensayo evalúa el efecto de la alimentación de la oveja durante la lactación sobre la presencia de carotenoides y vitaminas liposolubles en el plasma y los tejidos del cordero.

1. EFECTO DE LOS TANINOS CONDENSADOS SOBRE LOS PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO*.

1.1. Animales donantes de inóculo ruminal.

Para la obtención del inóculo ruminal, se utilizaron 4 machos castrados de raza Rasa Aragonesa canulados en el rumen con un peso vivo (PV) medio de $65 \pm 2,1$ kg. Los animales se alojaron en corrales individuales (150 x 150 cm) con acceso libre a agua y a un corrector vitamínico-mineral. La dieta de los animales estaba constituida por heno de alfalfa y grano de cebada en una proporción 70:30. La dieta se ajustó para cubrir las necesidades de mantenimiento y se distribuyó en dos comidas iguales, a las 8:00 h y a las 13:00 h. La composición química de la dieta era: 913 g/kg en materia seca (MS), 168 g/kg MS de proteína bruta (PB), 426 g/kg MS de fibra neutro detergente (FND) y de 269 g/kg MS de fibra ácido detergente (FAD). Dichos animales fueron manejados de acuerdo con las directrices españolas por las que se establecen las normas básicas aplicables a la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013), con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Centro de Investigación (Número de procedimiento 2011-05).

1.2. Sustratos utilizados en los ensayos.

1.2.1. Ensayo 1: Efecto en los parámetros de la fermentación *in vitro* de la inclusión de concentrado con y sin taninos condensados en forrajes de diferente calidad.

En el ensayo se emplearon dos forrajes con diferente calidad nutricional (forraje fresco vs. heno) y dos piensos para ovejas en lactación sin o con taninos condensados de quebracho (*Schinopsis balansae*) (control: pienso comercial vs. quebracho: pienso con 10% de quebracho). El esquema de los sustratos utilizados es el siguiente:

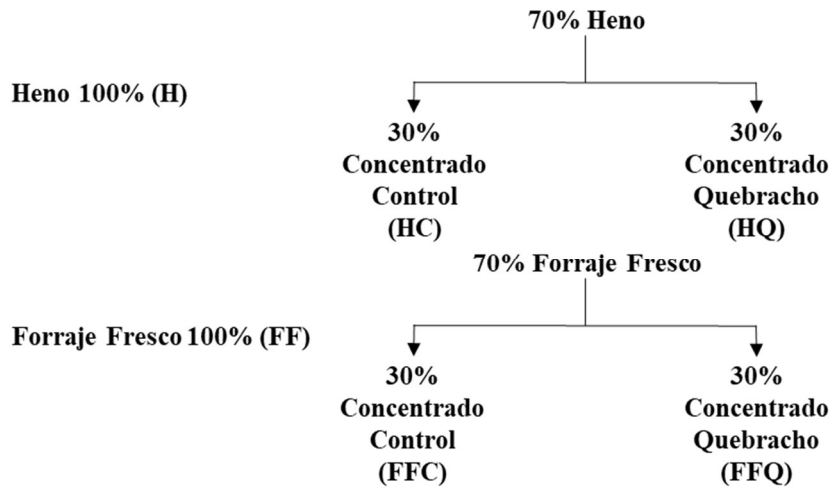


Figura 1. Ingredientes y dietas utilizadas en el Ensayo 1.

1.2.2. Ensayo 2: Efecto en los parámetros de la fermentación *in vitro* de los taninos condensados de la esparceta en diferentes estados fenológicos frente al empleo de polietilenglicol (PEG) o en comparación con la alfalfa.

Para este ensayo se emplearon esparceta (*Onobrychis viciifolia* cv. Reznos) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) en tres estados fenológicos distintos (vegetativo, inicio de floración y final de floración), utilizando polietilenglicol (PEG) en la esparceta como bloqueante del efecto de los taninos condensados. Los sustratos empleados en el presente ensayo se distribuyeron según el esquema siguiente:







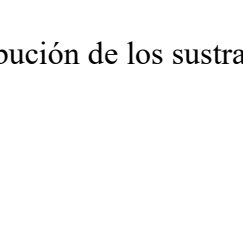
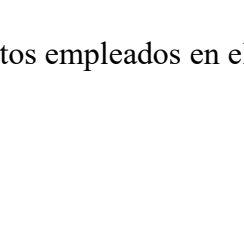
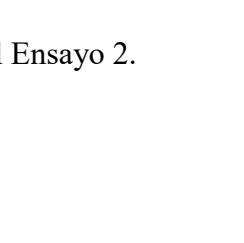
		Estado fenológico		
		Vegetativo	Inicio floración	Final floración
S u s t r a t o	Alfalfa			
	Esparceta			
	Esparceta +PEG			

Figura 2. Distribución de los sustratos empleados en el Ensayo 2.

1.2.3. Ensayo 3: Efecto del método de conservación en dos leguminosas ricas en taninos condensados sobre los parámetros de la fermentación *in vitro*.

En el Ensayo 3 se usaron dos leguminosas con taninos condensados: la esparceta (*Onobrychis viciifolia* cv. Reznos) y la zulla (*Hedysarum coronarium* cv. Carmen). Estos forrajes se evaluaron en fresco, en heno y en silo. Los sustratos empleados para la fermentación *in vitro* se distribuyeron según el siguiente esquema:

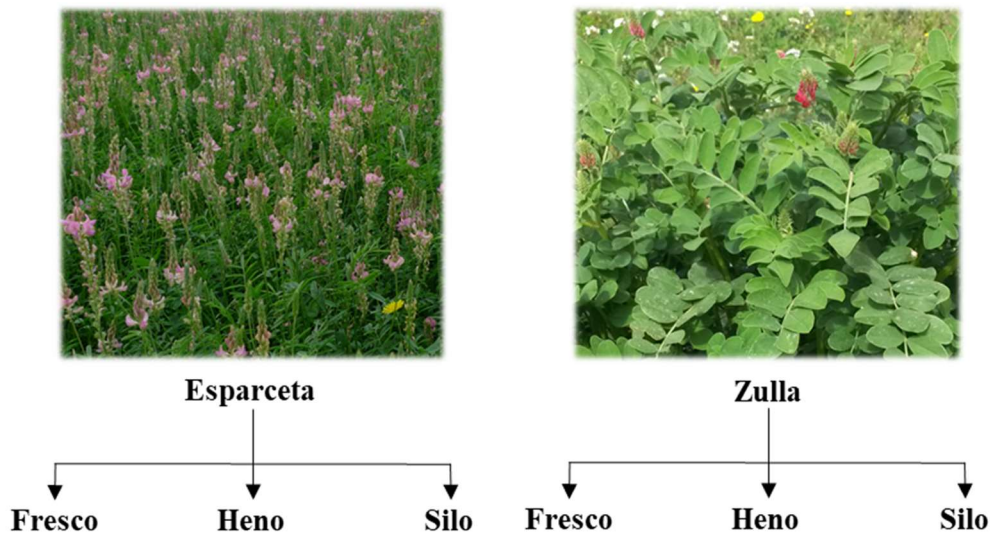


Figura 3. Detalle de los sustratos empleados en el Ensayo 3:

1.3. Técnica de fermentación *in vitro*: Sistema de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.

Previo a la obtención del contenido ruminal, se preparó un medio de cultivo que contenía soluciones tampón, reductora, de macrominerales, de microminerales y un indicador redox (resazurina) en las proporciones sugeridas por Menke y Steingass (1988). La solución final se mantuvo en un baño de agua a 39 °C y se gaseó con CO₂ durante aproximadamente 60 minutos para asegurar su reducción.

El contenido ruminal de cada animal se recogió antes de la oferta de la dieta y se introdujo en un termo precalentado a 39 °C con el fin de mantener la temperatura y evitar el contacto con aire, trasladándose inmediatamente al laboratorio. Una vez allí, el contenido ruminal de cada animal se filtró individualmente a través de 4 capas de gasa y los cuatro inóculos se mezclaron de manera proporcional. A dicha mezcla se incorporó el medio de cultivo preparado anteriormente en una proporción de 1:2 (v:v; inóculo ruminal:medio de cultivo), manteniéndose la mezcla resultante (en adelante medio de

cultivo inoculado) en condiciones de anaerobiosis y a 39 °C. En las muestras incubadas con PEG (Ensayo 2), se añadió PEG-4000 (Merck, Darmstadt, Alemania) con una concentración de 2,3 g/L de medio de cultivo inoculado (Theodoridou *et al.*, 2011b).

Para llevar a cabo las incubaciones se utilizaron botellas de 310 mL de capacidad, equipadas con sensores de presión y temperatura del sistema Ankom® (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.). En cada botella, se añadieron 500 mg de sustrato molido a 1 mm y 60 mL de medio del cultivo inoculado. Las botellas se cerraron herméticamente manteniendo las condiciones de anaerobiosis (en presencia de CO₂) y se introdujeron en un baño a 39 °C. La duración de la incubación en el Ensayo 1 fue de 24 horas, mientras que la incubación en los Ensayos 2 y 3 fue de 72 horas. En todos los ensayos se incluyeron réplicas de las muestras de sustrato y se realizaron varias tandas de incubación, además de incubar dos botellas por cada tanda con el medio de cultivo inoculado y sin sustrato que se usaron como blancos.

Durante la incubación, se recogió la presión cada hora mediante del sensor presente en el cabezal de cada botella del Sistema Ankom®. Cuando finalizó el periodo de incubación (24 o 72 h), las botellas se pusieron en hielo durante 5-10 minutos para detener la fermentación. Transcurrido este tiempo, las botellas se atemperaron durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recogió una alícuota del gas producido en un tubo Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) a presión atmosférica medida a través de un manómetro HD2304.0 (Delta Ohm, Padua, Italia). Dicha muestra se conservó a 4 °C hasta la determinación de la concentración de metano (CH₄). Seguidamente, se determinó el pH con un microPH 2002 (Crison Instruments S.A., Barcelona, España) y se tomaron muestras del líquido de la botella para determinar el amoníaco (NH₃-N) y los ácidos grasos volátiles (AGV). Para la determinación de NH₃-N se mezclaron 2,5 mL del contenido de la botella con 2,5 mL de HCl a 0,1 N. Mientras que para los AGV se mezclaron 0,5 mL del contenido de la botella con 1 mL de agua destilada y 0,5 mL de una solución desproteinizante (5 mL de ácido orto-fosfórico al 85% (v:v)) disuelto en 250 mL de agua destilada con 0,125 mL de ácido 4-metilvalérico usado como estándar interno). Las muestras para la determinación de la concentración de NH₃-N y AGV se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El contenido restante de las botellas se utilizó para la estimación la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO).

1.4. Técnicas de laboratorio y análisis químicos.

1.4.1. Análisis de la composición química.

Las muestras húmedas se desecaron en una estufa de ventilación forzada a 60 °C durante 48 h hasta peso constante con el objetivo de facilitar los análisis químicos posteriores. Las muestras desecadas se pesaron antes y después de la desecación para obtener el contenido en humedad del alimento. Dichas muestras se molieron en un molino rotatorio (ZM200 Retsch, Alemania) a 0,2 mm para la determinación de proteína bruta (PB) y a 1 mm para el resto de la composición química. La materia seca (MS), cenizas y la PB se determinaron siguiendo métodos de la AOAC (AOAC, 2000). El contenido de MS se determinó por desecación en una estufa Modelo ULM 400 (Memmert, Schwabach, Alemania) de ventilación forzada a 103 °C hasta peso constante (método 934.01). Posteriormente, la muestra seca se calcinó en un horno-mufla Modelo 367.PE (P-Selecta, Barcelona, España) a 550 °C durante 6 horas para determinar el contenido de cenizas (método 942.05). El contenido en materia orgánica (MO) se calculó por diferencia de la materia seca y las cenizas. El contenido de PB (Nitrógeno x 6,25) se determinó mediante el Procedimiento Dumas (método 968.06) utilizando un analizador de nitrógeno Modelo NA 2100 (Thermoquest SA, Barcelona, España). Los contenidos de fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) se determinaron de acuerdo con el método descrito por Van Soest *et al.* (1991) utilizando el analizador de fibra Ankom 200/220 (Ankom Technology Corporation). En los concentrados, para determinar la fracción FND se añadió alfa-amilasa estable al calor. La LAD se analizó en residuos de FAD por solubilización de celulosa con ácido sulfúrico. Todas las fracciones de fibra fueron corregidas por el contenido en cenizas. El extracto etéreo (EE) se determinó siguiendo el procedimiento Am 5-04 descrito en AOCS (2005) mediante un extractor XT10 Ankom (Ankom Technology Corporation). Los carbohidratos no estructurales (CNE) se calcularon de acuerdo con Guglielmelli *et al.* (2011), donde $CNE = 1000 - PB - EE - FND - cenizas$.

1.4.2. Análisis de polifenoles y taninos condensados.

Para la determinación de los polifenoles y taninos condensados, las muestras se liofilizaron en un liofilizador Virtis Genesis (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EE. UU.) y se molieron a través de una criba de 0,2 mm.

Los polifenoles totales se extrajeron según el método descrito por Makkar (2000) con las siguientes modificaciones: se mezclaron 200 mg de muestra y 5 mL de agua:acetona en proporción 1:1 (v:v) acidificada con ácido fórmico al 5% (v:v) en tubos de vidrio. La mezcla se homogeneizó en un vórtex orbital (Multi Reax, Heidolph, Alemania) durante 10 minutos. Seguidamente, los tubos se mantuvieron en un sonicador (Ultrasons HD, JP Selecta, Barcelona, España) durante 20 minutos y posteriormente se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus, Alemania). El sobrenadante se trasvasó a un tubo de vidrio de 10 mL y se conservó a 4 °C, repitiéndose por segunda vez el mismo proceso de extracción sobre el pellet. Los dos sobrenadantes se mezclaron y se centrifugaron a 4500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, usándose como un único extracto. La cuantificación de los polifenoles totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Julkunen-Tiitto (1985), usando como reactivos Folin-Ciocalteu y una solución acuosa de Na₂CO₃ (200 g/L). Las muestras y el estándar de referencia (ácido tánico; Sigma-Aldrich, Sant Louis, MI, EE. UU.) se midieron con un espectrofotómetro Helios β (Thermo Fisher Scientific) a 725 nm.

Para la determinación del contenido total de taninos condensados (TC) se pesaron de 20 a 200 mg de muestra (dependiendo del contenido en TC) en tubos de polipropileno y se extrajeron secuencialmente las fracciones de TC libres (TCL), ligados a proteína (TCP) y ligados a fibra (TCF) siguiendo el método de Terrill *et al.* (1992b). Los TCL se extrajeron en una solución acuosa de acetona al 70% (v:v) a la que se añade éter dietílico para eliminar compuestos interferentes como clorofilas y carotenoides. A continuación, se extraen los TCP mediante una ebullición con dodecilsulfato sódico, TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol) y 2-mercaptoetanol. El residuo resultante en forma de pellet sirvió para determinar los TCF. Una vez extraídos, la cuantificación de las diferentes fracciones de TC se realizó mediante el método colorimétrico del butanol-HCl (butanol:acetona:agua:HCl en proporción 42:50:3:5, v:v:v:v) propuesto por Grabber *et al.* (2013). El estándar de referencia utilizado para la cuantificación de las muestras se obtuvo de TC de la esparceta (para la esparceta, la zulla y los forrajes del Ensayo 1) y de TC del quebracho (para los concentrados el Ensayo 1) mediante el método descrito por Wolfe *et al.* (2008), usando una solución acuosa de acetona al 70% (v:v) para la extracción y gel comercial de dextrano Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) para la purificación. Las muestras y los estándares de calibración se midieron con un espectrofotómetro Helios β a 550 nm.

1.4.3. Determinación de la concentración de metano.

El metano se determinó mediante un cromatógrafo de gases HP-4890 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar TG-BOND Q+ de 30 m x 0,32 mm d.i. x 10 μm de tamaño de partícula (Thermo Fisher Scientific), utilizando helio como gas portador a un caudal de 1 mL/min. La temperatura del inyector, el detector y el horno se mantuvieron a 200 °C, 250 °C y 100 °C (programa isotérmico), respectivamente. Se inyectaron manualmente 200 μL en splitless con una jeringa hermética Hamilton®. La identificación y cuantificación de la concentración de CH_4 se basó en el tiempo de retención y relación del área del pico con el contenido en CH_4 generada a partir del gas estándar de referencia (CH_4 ; 99.995% de pureza [C45], Carburos Metálicos, Barcelona, España).

1.4.4. Determinación de la concentración de amoníaco.

El contenido de amoníaco se evaluó mediante un método colorimétrico basado en la reacción de Berthelot (Chaney y Marbach, 1962), utilizando cloruro de amonio como estándar de calibración. Para ello, las muestras y los estándares de la recta de calibrado se trataron con fenol e hipoclorito de sodio y tras una incubación en oscuridad de 45 minutos a temperatura ambiente, se midieron a 625 nm en un espectrofotómetro de placas Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

1.4.5. Determinación de ácidos grasos volátiles.

La cuantificación total de los AGV y de las proporciones molares del ácido acético, propiónico, butírico, iso-butírico, valérico e iso-valérico se determinaron utilizando un cromatógrafo de gases Bruker Scion 436 (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.), equipado con inyector automático CP-8400 (Bruker), un detector de ionización de llama y una columna capilar GS-BR-SWAX de 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm de tamaño de película (Bruker). Se usó helio como gas portador a un caudal de 1 mL/min. La temperatura en el inyector fue de 220 °C y en el detector de 230 °C, siendo la temperatura inicial de la columna de 100 °C, seguida de un aumento de 6 °C/min hasta 160 °C y disminuyendo de nuevo a 100 °C para la siguiente inyección. El volumen de inyección fue de 1 μL en *split* (1:50). Los AGV se identificaron comparando su tiempo de retención con estándares comerciales de ácido acético, propiónico, butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico, y 4-metil-valérico (como estándar interno), todos ellos de pureza $\geq 99\%$

(Sigma-Aldrich). La cuantificación se realizó a partir de una recta de calibrado con concentraciones de AGV en proporciones similares a las fisiológicas y representando gráficamente [Área AGV/Área estándar interno] vs. [Concentración AGV].

1.4.6. Determinación de la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica.

La degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) después de la incubación se estimó filtrando todo el contenido de las botellas a través de una bolsa de nylon (50 µm; Ankom, NY, EE. UU.) previamente pesada. Las bolsas selladas con el contenido se lavaron con agua destilada hasta que quedaron completamente claras y se secaron a 60 °C hasta un peso constante. Una vez secas, se pesó el contenido de cada bolsa, el cual se desecó a 103 °C durante 48 h. Posteriormente, la muestra se colocó en una mufla a 550 °C para obtener las cenizas. La DIVMO se calculó como:

$$= \frac{MO_{\text{inicio incubación}} - (MO_{\text{final incubación}} - MO_{\text{blanco}})}{MO_{\text{inicio incubación}}}$$

2. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN DE LA OVEJA EN LACTACIÓN SOBRE LOS CONTENIDOS EN CAROTENOIDES Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN EL PLASMA Y LOS TEJIDOS DEL CORDERO.

El manejo y los procedimientos a los que se sometieron a los animales se amparan en las directrices españolas por las que se establecen las normas básicas aplicables a la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013) y la protección de los animales en el momento de sacrificio (Reglamento CE N° 1099/2009).

2.1. Animales, alimentos y diseño experimental.

Se utilizaron ovejas de raza Rasa Aragonesa procedentes del rebaño experimental de la finca de Soto Lezcano del CITA (Zaragoza). Se sincronizaron todas las ovejas del rebaño utilizando esponjas vaginales con acetato de flugestona (Sincropat 30 mg, Ceva Salud Animal, S.A., Barcelona, España). Tras el parto se seleccionaron 31 ovejas de parto simple con cordero macho, teniendo en cuenta el peso vivo (PV; 48,9 ± 6,1 kg) y la condición corporal (2,77 ± 0,39) de las ovejas (para más detalles, ver Lobón *et al.*, 2017a).

Se evaluaron tres sistemas de alimentación durante la lactación:

- Intensivo: 11 parejas oveja-cordero se alojaron en una nave. Las ovejas recibieron una ración mixta seca específica para lactación (Rum Paca OC-01, Oviaragon, Zaragoza, España), compuesta principalmente por paja de cebada (50%), granos de cereal, oleaginosas y correctores (ver más detalles en Capítulo 4).

- Alfalfa: 10 parejas oveja-cordero pastaron en praderas de alfalfa de manera rotacional.

- Esparceta: 10 parejas oveja-cordero pastaron en praderas de esparceta de manera rotacional.

En el siguiente esquema se muestra el manejo de los animales:




Parto	Destete 42 d		Sacrificio 22-24 kg
	Alimentación de la oveja en lactación	Alimentación del cordero en lactación	
Mezcla completa n=11		Leche + Concentrado	Paja + Concentrado
Alfalfa n=10		Leche + Concentrado	Paja + Concentrado
Esparceta n=10		Leche + Concentrado	Paja + Concentrado

Figura 4. Diseño experimental del Ensayo 4.

Las ovejas y sus corderos se distribuyeron de forma equilibrada y equitativa en los tres sistemas de alimentación anteriormente mencionados según la fecha del parto, el PV de la oveja y el PV del cordero al inicio del experimento. Cada sistema de alimentación tuvo dos repeticiones (5 o 6 parejas oveja-cordero para cada repetición). Desde el inicio, los corderos tuvieron acceso *ad libitum* a un concentrado comercial a

través de un comedero selectivo exclusivo para ellos, que les sirvió de adaptación al periodo de cebo, evitando problemas potenciales en el destete temprano.

Cuando los corderos alcanzaron los 42 ± 2 d de edad, se destetaron. Durante el periodo de cebo, todos los corderos recibieron paja *ad libitum* y el mismo concentrado [compuesto principalmente por maíz (35%), harina de soja (24%), trigo (20%) y cebada (15%)]. Todos los animales tuvieron acceso libre a agua y a bloque corrector vitamínico-mineral durante todo el periodo de ensayo. Los corderos se sacrificaron cuando alcanzaron un peso vivo de 22-24 kg.

2.2. Toma de muestras.

2.2.1. Alimentos.

Semanalmente se tomaron muestras de todos los alimentos usados en el ensayo. En el caso de los forrajes, se tomaron cinco cuadrantes de 0,25 m² ubicados al azar en cada parcela, teniendo en cuenta todo el material vegetal a más de 3 cm sobre el nivel del suelo. Todas las muestras de forraje se trasladaron al laboratorio de Valoración Nutritiva de la Unidad de Producción y Sanidad Animal para llevar a cabo análisis. Cada muestra se dividió en una submuestra para la estufa de ventilación forzada a 60 °C hasta peso constante y otra submuestra para liofilizar. Para los análisis de carotenoides y tocoferoles se usaron las muestras liofilizadas y molidas a 0,2 mm. Todas las muestras se conservaron a -80 °C hasta posteriores análisis.

2.2.2. Plasma y tejidos del cordero.

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de los corderos en tubos de vacío con heparina (Vacuette, Kremsmünster, Austria) para el análisis de los carotenoides y tocoferoles en plasma al inicio del ensayo, al destete y antes del sacrificio. Las muestras se centrifugaron a 3.000 x g durante 15 min y a 4 °C, y el plasma obtenido se congeló a -80 °C hasta su posterior análisis.

Los corderos se sacrificaron en el matadero experimental del CITA (Zaragoza) utilizando los procedimientos comerciales estándares de acuerdo con la normativa vigente. Después del sacrificio, las canales se orearon a 4 °C durante 24 horas en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron muestras del músculo *longissimus dorsi* entre las vértebras lumbares 1-6, del hígado, de la grasa renal y grasa subcutánea de la zona caudal.

Las muestras de músculo e hígado se liofilizaron, se picaron en un molino de cuchillas y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Mientras que las muestras de grasa, tal cual se extrajeron, se envasaron a vacío en bolsa opaca y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongelándose posteriormente y usándose en fresco para los análisis.

2.3. Análisis de carotenoides y vitaminas liposolubles.

2.3.1. Extracción en las muestras de alimento.

Los carotenoides y tocoferoles en los alimentos se extrajeron a partir de 50 mg de muestra en los forrajes y 200 mg de muestra para los piensos. La extracción de estos compuestos se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Fu *et al.* (2011), mediante agitación orbital de las muestras con 3 mL de una disolución de metanol: acetona:éter de petróleo en proporción 1:1:1 (v:v:v; BHT al 0,01% p:v) y repitiendo el proceso tres veces hasta obtener un pellet blanco. Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante de los extractos de los forrajes y el total del sobrenadante de los piensos y se procedió a su evaporación completa en un evaporador de vacío (RVC 2-25 Christ, Osterode am Harz, Alemania), disolviendo el residuo seco de los mismos en 1 mL de acetonitrilo:metanol:diclorometano (75:15:10; v:v:v), se filtró a través de un filtro de PTFE de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ y se transfirió a un vial de vidrio ámbar para su determinación mediante UPLC usando $5\text{ }\mu\text{L}$.

2.3.2. Extracción en las muestras de plasma y tejidos del cordero.

En el plasma, la extracción se realizó siguiendo el procedimiento de Lyan *et al.* (2001) con las siguientes modificaciones: 1 mL de plasma se desproteinizó con el mismo volumen de etanol y los componentes lipófilos se extrajeron dos veces agregando 5 mL de hexano:acetato de etilo en proporción 9:1 v:v ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$ BHT). La fase superior compuesta por hexano y acetato de etilo se recogió y se evaporó en un evaporador de vacío. El residuo seco se disolvió en 1 mL de acetonitrilo:metanol:diclorometano (75:15:10; v:v:v), se filtró a través de un filtro de PTFE de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ y se transfirió a un vial de vidrio ámbar para su determinación mediante UPLC usando $5\text{ }\mu\text{L}$.

Con respecto a los tejidos animales, el método de extracción fue el mismo para todos, diferenciándose únicamente en la cantidad y estado de la muestra utilizada: 200 mg de carne liofilizada, 50 mg de hígado liofilizado y 100 mg de grasa fresca. La extracción se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bertolín *et al.* (2018),

mediante la adición de 200 mg de ácido L-ascórbico y la saponificación con 3 mL de solución compuesta por hidróxido de potasio al 10% (p:v) disuelta en etanol:agua destilada a 50:50 (v:v). Tras el proceso de saponificación, se añadieron 5 mL de hexano:acetato de etilo en proporción 9:1 (v:v; 5 µg/mL BHT) se agitó y se centrifugó, recogiendo la solución orgánica. Dicho proceso anterior se repitió, recuperándose toda la solución orgánica un tubo de vidrio ámbar de 12 mL. Dicha solución se evaporó en un evaporador de vacío, disolviéndose el residuo seco en 1 mL de acetonitrilo:metanol:diclorometano (75:15:10, v:v:v), se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,22 µm y se transfirió a un vial de vidrio ámbar para su determinación mediante UPLC usando 5 µL.

2.3.3. Condiciones cromatográficas.

Para la cuantificación de los carotenoides y tocoferoles se usó un cromatógrafo de líquidos clase ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, Massachusetts, EE. UU.) equipado con una columna de fase reversa (Acquity UPLC HSS T3, 150 mm x 2,1 mm d.i. x 1,8 µm tamaño de partícula, Waters), un detector de absorbancia (Acquity UPLC Photodiode Array PDA eλ Detector, Waters) y un detector de fluorescencia (2475 Multi λ Fluorescence Detector, Waters).

Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de carotenoides y tocoferoles en alimentos se basaron en la metodología descrita por Chauveau-Duriot *et al.* (2010), usándose un gradiente a partir de dos fases móviles distintas, acetonitrilo:metanol:diclorometano (75:15:10, v:v:v) y 0,05 M de acetato de amonio en agua ultrapura, con un flujo constante de 0,4 mL/min. Mientras que para la cuantificación de carotenoides y tocoferoles en plasma y tejidos animales se basaron en la metodología descrita por Bertolín *et al.* (2018), usándose acetonitrilo:metanol:diclorometano (75:15:10, v:v:v) como fase móvil y un flujo de 0,3 mL/min.

Los carotenoides y el retinol se detectaron por absorbancia a 325 nm y 450 nm respectivamente, mientras que los tocoferoles se detectaron por emisión de fluorescencia con 295 nm como longitud de onda de excitación (λ_{exc}) y 330 nm como longitud de onda de emisión de (λ_{emi}). El β -caroteno, el retinol, la luteína y los tocoferoles se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus análisis espectrales, cuantificándose mediante calibración externa a partir de sus estándares puros (Sigma-Aldrich). La zeaxantina, la neoxantina, la violaxantina, el 13Z- β -caroteno y el 9Z- β -

caroteno se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus análisis espectrales reportados en estudios previos (Rodríguez-Amaya, 2001; Chauveau-Duriot *et al.*, 2010), y se cuantificaron (análisis semicuantitativo) mediante el cálculo del factor de respuesta para la calibración de β -caroteno basado en sus coeficientes de absorción molar (Rodríguez-Amaya, 2001).

3. CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los datos de todos los ensayos se analizaron utilizando el software estadístico SAS v. 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC. EE. UU.).

3.1. Cálculos.

3.1.1. Cálculo de la producción de gas.

A partir de los valores de presión obtenidos con el Sistema Ankom, corregidos tanto para la cantidad de materia orgánica (MO) degradada como para la producción de gas de los blancos, se calculó el volumen de gas producido mediante una serie de cálculos matemáticos.

Primeramente, la presión obtenida en PSI se transformó en kPa, mediante la equivalencia de 1 PSI= 6,89476 kPa.

Posteriormente los kPa se pasaron a moles mediante la fórmula de los gases ideales.

$$P * V = nRT$$

Donde “P” representa la presión (kPa), “V” el volumen donde se contiene el gas (L), “n” el número de moles, “R” una constante de los gases ideales (8,314472 J/mol*K) y “T” la temperatura a la que se encuentra el gas (°K). Para realizar los cálculos, las condiciones del gas en los ensayos de fermentación *in vitro* fueron de 0,25 L de volumen y 312 °K de temperatura.

Por último, los mL de producción de gas se calcularon a partir de los moles obtenidos previamente, mediante el volumen molar de los gases ideales (22,4 mol/L).

3.1.2. Cinética de producción de gas en los sistemas de cultivos no renovados de microorganismos ruminales.

Para el estudio de la cinética de producción de gas se ajustó el volumen de gas con el tiempo mediante un procedimiento de regresión no lineal (NLIN en SAS) al siguiente modelo matemático propuesto por France *et al.* (2000):

$$p = A \times (1 - e^{-ct})$$

En esta ecuación “*p*” representa la producción de gas acumulada (mL) para un determinado tiempo “*t*” de incubación (h). “*A*” y “*c*” son dos constantes, que representan la asíntota o producción potencial de gas (mL) y la velocidad de producción de gas o de degradación del sustrato (h^{-1}), respectivamente. Para el cálculo de dichas constantes se utilizaron los valores medios de producción de gas correspondientes a cada hora de incubación para cada tipo de dieta, estando corregidos por los valores medios de los blancos a cada hora.

3.2. Análisis estadísticos.

3.2.1. Composición química y contenidos en compuestos secundarios.

En los Ensayos 1, 2 y 4 se presentó la media y desviación estándar de la composición química y los contenidos en compuestos secundarios.

En el Ensayo 3 se analizó la composición química y los contenidos en polifenoles y TC mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento de modelos lineales generalizados (proc GLM) para cada forraje por separado con el método de conservación como efecto fijo.

3.2.2. Parámetros de la fermentación *in vitro*.

En el Ensayo 1 se analizaron los parámetros de fermentación y de cinética de producción de gas con un ANOVA con el sustrato como efecto fijo. Se usó el contraste ortogonal para comparar las diferencias entre el tipo de forraje, heno *vs.* forraje fresco (H, HC y HQ *vs.* FF, FFC y FFQ) y el efecto de la inclusión de concentrado control o quebracho en la dieta basada en heno (H *vs.* HC y H *vs.* HQ) y en la dieta basada en forraje fresco (FF *vs.* FFC y FF *vs.* FFQ).

En los Ensayos 2 y 3 los parámetros de fermentación y cinética de producción de gas se analizaron con modelos mixtos. En el Ensayo 2 se consideraron como efectos fijos el sustrato, el estado fenológico y su interacción y como efecto aleatorio la tanda. En el Ensayo 3 se realizó el tratamiento estadístico de cada forraje por separado porque diferían en el estado fenológico cuando se cosecharon para su estudio. Se consideró como efecto fijo el método de conservación y como efecto aleatorio la tanda.

En todos los análisis, se obtuvieron las medias corregidas (LSMEANS), sus errores estándar asociados y las diferencias entre las medias. Se utilizó el análisis de correlación de Pearson entre los contenidos de las fracciones de TC o la DIVMO y los parámetros de la fermentación *in vitro* mediante el procedimiento CORR de SAS. Los efectos se consideraron significativos cuando el valor de probabilidad fue $P < 0,05$ o una tendencia cuando $0,05 \leq P \leq 0,10$.

3.2.3. Estudio de carotenoides y vitaminas liposolubles en suero y tejidos del cordero.

En primer lugar, se analizó la normalidad de los residuos de los carotenoides y tocoferoles de todas las matrices con el test de Shapiro-Wilk. Aquellos parámetros que no cumplieron la normalidad se analizaron con análisis no paramétricos mediante el procedimiento NPAR1WAY. Se compararon las medias dos a dos.

La concentración de los analitos en el plasma cuyos residuos tuvieron una distribución normal se analizaron con un modelo mixto de medidas repetidas con la alimentación en lactación, el muestreo y su interacción como efectos fijos y el cordero como efecto aleatorio. Se evaluaron diferentes estructuras de la matriz de varianza-covarianza para modelizar el error residual. Se eligió la matriz con el menor criterio de información bayesiano. La concentración de carotenoides, retinol y tocoferoles en los tejidos animales con distribución normal de residuos se analizaron mediante un análisis de varianza con la alimentación en lactación como efecto fijo. Se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas y los errores asociados.

Para cada tejido y muestreo de plasma, se estudió la discriminación de la alimentación recibida por los corderos en lactación según la concentración de analitos (Proc discrim). Además, dado que el cordero se comercializa por canales enteras o medias canales se estudió la posibilidad de aplicar la trazabilidad de la canal con los analitos de todos los

tejidos. En primer lugar, se redujo el número de variables explicativas (Proc stepwise), y posteriormente, se realizó el estudio de la discriminación con las variables seleccionadas.

IV. Resultados y Discusión

Los Resultados y Discusión de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en el formato de cuatro capítulos científicos que se enumeran a continuación:

- **Capítulo 1:** “The inclusion of concentrate with quebracho is advisable in two forage-based diets of ewes according to the fermentation parameters”. Rufino-Moya, P. J., Blanco, M., Lobón, S., Bertolín, J. R., Armengol, R. and Joy, M. En revisión en la revista *Animals*.
- **Capítulo 2:** “Methane production of fresh sainfoin, with or without PEG, and fresh alfalfa at different stages of maturity is similar but the fermentation end products vary”. Rufino-Moya, P. J., Blanco, M., Bertolín, J. R. and Joy, M. Publicado en la revista *Animals*, 9 (5): 197 (2019).
doi: 10.3390/ani9050197
- **Capítulo 3:** “Effect of the method of preservation on the chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics in two legumes rich in condensed tannins”. Rufino-Moya, P. J., Blanco, M., Bertolín, J. R. and Joy, M. Publicado en la revista *Animal Feed Science and Technology*, 251: 12-20 (2019).
doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.02.005
- **Capítulo 4:** “Effects of feeding system during lactation on the content of carotenoids and liposoluble vitamins in plasma and tissues of light lambs. Use of these compounds for traceability of feeding system”. Rufino-Moya, P. J., Joy, M., Lobón, S., Bertolín, J. R. and Blanco, M.

Capítulo 1

**The inclusion of concentrate with quebracho is
advisable in two forage-based diets of ewes
according to the *in vitro* fermentation parameters**

Pablo. J. Rufino-Moya, Mireia Blanco, Sandra Lobón, Juan R. Bertolín,
Ramón Armengol and Margalida Joy

SIMPLE SUMMARY.

In dry mountainous areas, ewes are fed low-quality forages (hay or straw) indoors, although they also graze in high-quality pastures when available. Concentrate supplementation is recommended to cover high nutritional requirements during lactation. Condensed tannins (CT) of quebracho (*Schinopsis balansae*) can be included in the concentrate to reduce methane emissions and ruminal degradation of protein, improving the efficiency of the fermentation. Furthermore, low levels of quebracho can improve some meat and milk quality traits. The effects of the inclusion of concentrate and CT in diets depend on the level of inclusion and the quality of forage. The aim of this study was to evaluate the fermentation characteristics of diets fed to ewes under farming conditions in order to recommend the most advisable ones depending on the quality of the forage available, comparing hay vs. fresh forage diets and forage alone vs. 70:30 forage:concentrate with (quebracho) or without CT (control) in each type of forage. The main results were that the fermentation of fresh forage-based diets was more efficient than that of the hay-based diets, and that the inclusion of quebracho concentrate increased the *in vitro* organic matter degradability (IVOMD) in hay-based diets and reduced ammonia content in fresh forage-based diets.

ABSTRACT.

Ewes receive hay or graze on fresh pastures supplemented with concentrates to fulfil their lactation requirements. Quebracho (*Schinopsis balansae*) can be added to change the ruminal fermentation. Fermentation parameters of forages alone and 70:30 forage:concentrate diets with control and quebracho concentrate were compared after 24 h of *in vitro* incubation. Fresh forage diets produced less gas ($P < 0.05$) and had greater *in vitro* organic matter degradability (IVOMD) ($P < 0.001$), $\text{NH}_3\text{-N}$ content, valeric acid, branched-chain volatile fatty acid proportions, and lower propionic acid proportion than the hay diets ($P < 0.01$). In the hay diets, gas or methane production were not affected by the inclusion of concentrates, irrespective of the presence of quebracho. The inclusion of both concentrates increased the acetic:propionic ratio ($P < 0.01$), and only the inclusion of quebracho concentrate increased IVOMD ($P < 0.01$). In the fresh forage diets, gas and methane production increased with the inclusion of the control concentrate ($P < 0.05$) but not with quebracho concentrate. The inclusion of quebracho concentrate reduced the ammonia content and valeric acid proportion ($P < 0.05$). In conclusion, the inclusion of

quebracho concentrate would be more advisable than the control concentrate to increase efficiency in hay diets and protect the degradation of protein in fresh forage diets.

Keywords:

Condensed tannins; gas production; methane production; fresh forage; hay; *in vitro*; organic matter degradability.

1. INTRODUCTION.

In dry mountainous areas, ewes are usually stalled around parturition and fed cheap, low-quality forages (hay or straw) supplemented with concentrates/grain throughout lactation to fulfil their maintenance and lactation requirements. However, ewes can raise their suckling lambs at pasture during spring (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2007; Joy *et al.*, 2012). In recent years, the condensed tannins (CT) from quebracho (*Schinopsis balansae*) have been incorporated into the diet of dairy ewes to improve their performance during lactation and the quality of the milk (Buccioni *et al.*, 2015). In a local breed, the inclusion of quebracho in the concentrate of grazing and hay-fed ewes affected milk protein content (Lobón *et al.*, 2017b) and some meat quality traits of the suckling lambs (Lobón *et al.*, 2017c).

The forages fed to local breeds in these systems differ greatly in their chemical composition, especially the contents of structural carbohydrates and protein, which affect the parameters of ruminal fermentation (Getachew *et al.*, 1998). The fermentation of low-quality forages leads to high gas and methane (CH₄) production (Beauchemin *et al.*, 2009) to the detriment of microbial biomass synthesis (Mauricio *et al.*, 2001). The inclusion of concentrate in diets to cover the nutritional requirements during lactation can reduce the production of methane (Beauchemin *et al.*, 2008) and ammonia in the rumen through the enhancement of the direct incorporation of amino N into microbial protein (Agle *et al.*, 2010). The ruminal fermentation parameters could be modified by the presence of CT because they have antimicrobial and antiprotozoal activity as well as the capacity to bind components of the diet, especially protein (Mueller-Harvey, 2006). Condensed tannins from quebracho can reduce the production of gas, CH₄ (Jayanegara *et al.*, 2015a), and NH₃-N (Getachew *et al.*, 2008) or change the molar proportions of volatile fatty acid (VFA) production (Martínez *et al.*, 2006). However, the effect of the CT on the parameters of ruminal fermentation depends on the diet, the concentration of CT, and the

ruminant species (Frutos *et al.*, 2004b; Hassanat and Benchaar, 2013). The aim of this study was to compare the fermentation characteristics of diets fed to ewes under farming conditions in order to recommend the most advisable ones depending on the quality of the forage available.

2. MATERIAL AND METHODS.

2.1. Experimental design.

Two forages of different quality (hay *vs.* fresh forage) and two concentrates without or with quebracho CT (control *vs.* quebracho) were used in this experiment. The forages alone and the four diets composed of 70:30 forage:concentrate were incubated *in vitro* for 24 h. The fermentation parameters between both forage-based diets and the effect of the inclusion of control or quebracho concentrate within each forage with respect to the forage alone were compared.

2.2. Animal and diets.

2.2.1. Feedstuffs and substrates.

The forage samples were obtained from a meadow located at La Garcipollera Research Station in the mountainous area of the southern Pyrenees (northeastern Spain; 42°37'N, 0°30'W; 945 m a.s.l.). The meadow was composed of 20% legumes (mainly *Trifolium repens*), 68% grass (the main species were *Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis*, and *Dactylis glomerata*), and 12% other species (mainly *Rumex acetosa* and *Ranunculus bulbosus*). Hay was obtained from forage harvested at late bud stage (July 2013), as farmers usually do to maximize forage production, and was of a medium–low quality. The forage was sun-dried and baled. Fresh forage samples were collected at the beginning of vegetative growth (March 2014), which is the stage of the forage at the beginning of the grazing period of the ewes in mountainous areas. The isoenergetic (10.4 MJ metabolizable energy/kg as fed) and isoproteic (14% crude protein (CP), as fed) concentrates were formulated to fulfil the requirements of lactating ewes. The ingredients of the control concentrate were barley (34%), bran (20%), corn gluten feed (18%), sunflower flour (12%), corn grain (10%), alfalfa pellet (2%), calcium carbonate (2%), molasses (1%) and mineral mix (1%). The ingredients of the quebracho concentrate were barley (49%), corn gluten feed (15%), soybean meal (12%), quebracho extract (10%;

SYLVAFEED ByPro Q, Adial Nutrition. Gerona, Spain, with 75% CT), bran (6%), corn grain (5%) calcium carbonate (2%) and mineral mix (1%).

The samples of the feedstuffs were dried in an oven at 60 °C for 48 h to determine the chemical composition, except a part of samples that was immediately freeze-dried to determine CT content and to be incubated in the *in vitro* assays. All the samples were ground (Rotary Mill, ZM200 Retsch, Germany) and sieved through a 1-mm screen except for the parts used to determine CP and CT contents, which were sieved through a 0.2-mm screen. All the samples were stored in total darkness at – 20 °C until further analyses.

Both forages and the four diets were *in vitro* assessed. The feedstuffs used were the abovementioned forages plus concentrate: control or quebracho concentrate. Therefore, the following substrates were incubated: hay alone (H), fresh forage alone (FF), 70% hay plus 30% control concentrate (HC), 70% hay plus 30% quebracho concentrate (HQ), 70% fresh forage plus 30% control (FFC), and 70% fresh forage plus 30% quebracho concentrate (FFQ).

2.2.2. Animals and sampling of ruminal digesta.

All procedures used in the experiment were carried out in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (RD 53/2013) with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Research Centre (procedure number 2011-05). The ruminal contents were collected into a prewarmed insulated thermo before morning feeding from four rumen cannulated Rasa Aragonesa wethers (65 ± 2.1 kg body weight) fed 70:30 alfalfa hay:barley grain at an energy maintenance level. For more details, read Rufino-Moya *et al.* (2019). Rumen fluid from the four wethers was mixed, and a buffer solution was added in a proportion of 1:2 (v/v) based on the protocol of Menke and Steingass (1988).

2.2.3. In vitro gas production technique and sampling.

The Ankom system (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, USA) was used to determine the gas production following the conditions described in Rufino-Moya *et al.* (2019). Five hundred milligrams of samples were incubated with 60 mL of buffered solution:rumen fluid (2:1, v/v) in a water bath at 39 °C for 24 h. Three runs were conducted on three days in consecutive weeks. Blanks were included in each run. The samples and

blanks were incubated in triplicate in each run. Gas production was recorded for 24 h and corrected with the blanks.

After 24 h of incubation, the bottles were placed in ice to stop fermentation (5–10 min) and then tempered at room temperature for 10–15 min. The sampling to determine CH₄ production, NH₃-N content, and VFA proportions was carried out according to Rufino-Moya *et al.* (2019). Briefly, a sample of gas produced was transferred into vacutainer tube to determinate CH₄. After gas sampling, the pH was measured immediately with a microPH 2002 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). For NH₃-N determination, 2.5 mL of liquid was mixed with 2.5 mL HCl 0.1 N, and for VFA determination, 0.5 mL of the liquid was added to 0.5 mL of deproteinizing solution and 1 mL of distilled water. Tubes with gas samples were stored at 4 °C, and those with samples for determination of NH₃-N and VFA were stored at -20 °C until future analyses. The entire bottle content was filtered through a preweighed bag (50 µm; Ankom) to estimate the *in vitro* organic matter degradability (IVOMD). Briefly, the bags were sealed, washed, dried at 103 °C for 48 h, and finally placed in a muffle at 550 °C to obtain the ashes. The organic matter of the bag content was obtained as dry matter (DM) ashes, and the IVOMD was calculated.

2.3. Analytical methods.

2.3.1. Chemical composition.

All the analyses of the chemical composition and secondary compounds were analyzed according to official methods as reported in Rufino-Moya *et al.* (2019). The DM, ash, and CP were determined according to the AOAC methods (AOAC, 2000). Neutral detergent fiber (NDFom), acid detergent fiber (ADFom) and lignin (sa) contents were determined using the method of Van Soest *et al.* (1991). The ether extract (EE) was determined following the Ankom Procedure (AOCS, 2005) with an XT10 Ankom extractor (Ankom Technology Corporation). The nonstructural carbohydrates (NSC) were calculated as $NSC = 1000 - CP - EE - NDF - ash$, according to Guglielmelli *et al.* (2011). The content of total polyphenols (TP) was extracted using the method of Makkar (2000) and determined with the method of Julkunen-Tiitto (1985). The extractable CT (ECT), protein-bound CT (PBCT), and fiber-bound CT (FBCT) were extracted according to Terrill *et al.* (1992b) and quantified at 550 nm based on the method described by Grabber *et al.* (2013). The standards used for quantification of the samples were extracted and purified from

sainfoin for forages and quebracho (SYLVAFEED ByPro Q) for concentrates by the method described Wolfe *et al.* (2008).

2.3.2. Determination of the parameters of *in vitro* fermentation.

The gas production recorded hourly for 24 h by the Ankom system was used to estimate the parameters of the kinetics of fermentation, adjusting the gas produced to the model described by France *et al.* (2000):

$$p = A \times (1 - e^{-ct})$$

where p is the cumulative gas production (mL) at time t (h), A is the potential gas production (mL), and c is the rate of gas production (h^{-1}).

Methane was determined in an HP-4890 (Agilent, St. Clara, CA, USA) gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID) and a TG-BOND Q+ capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 10 μm film thickness, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The carrier gas was helium, at a flow rate of 1 mL/min. The temperature of the oven was maintained at 100 °C (isothermal program). The volume of the splitless injection was 200 μL . The identification of CH_4 was based on the retention time compared with the standard. The concentration was calculated from the peak concentration:area ratio using the peak area generated from standard gas as the reference (CH_4 ; 99.995% purity [C45], Carburos Metálicos, Barcelona, Spain).

Ammonia content was determined in an Epoch microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using the colorimetric method described by Chaney and Marbach (1962).

The concentration of acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, and valeric acids was measured in a Bruker Scion 460 GC (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped with a CP-8400 autosampler, FID, and a BR-SWax capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness, Bruker). The carrier gas was helium (flow rate of 1 mL/min). The temperature program of the oven was 100 °C, followed by a 6 °C/min increase to 160 °C. The injection volume was 1 μL at a split ratio of 1:50. The identification of the individual VFA was based on retention time comparisons with commercially available standards of acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, valeric, and 4-methyl-valeric acids at \geq 99% purity (Sigma-Aldrich).

2.3.3. Calculations and statistical analysis.

Data were analyzed using statistical software SAS V.9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The fermentation kinetic parameters (A and c) were estimated through a nonlinear regression model ($Y = a + b \cdot X$) using the SAS NLIN program. The total gas, methane, A , c , IVOMD, and the fermentation end-products were tested by analysis of variance using the GLM procedure of SAS. Orthogonal contrasts were used to compare the difference between type of forage (H, HC, and HQ vs. FF, FFC, and FFQ) and the effect of the inclusion of control or quebracho concentrate on hay-based diets (H vs. HC and H vs. HQ) and fresh forage-based diets (FF vs. FFC and FF vs. FFQ). The effects were considered significant or a trend was found at a probability value of $P < 0.05$ and $0.05 \leq P < 0.10$, respectively.

3. RESULTS.

The chemical composition of the feedstuffs is shown in Table 1. As expected, the hay had higher fiber contents and lower CP and NSC contents than the fresh forage. The content of condensed tannins in both forages was almost negligible. Regarding the concentrates, both had similar CP but different NDFom, ADFom, lignin (sa), and NSC contents. The inclusion of quebracho in the concentrate increased total polyphenols and CT contents.

Table 1. Chemical composition of feedstuffs.

Items	Forage		Concentrate	
	Hay	Fresh	Control	Quebracho ¹
Dry matter (DM) (g/kg)	883	183	887	885
Ash (g/kg DM)	83	13	72	71
CP (g/kg DM)	75	263	153	155
NDFom ² (g/kg DM)	678	488	270	193
ADFom (g/kg DM)	362	202	85	66
Lignin (sa) (g/kg DM)	43	40	22	12
Ether extract (g/kg DM)	18	33	31	30
Nonstructural carbohydrates (g/kg DM)	146	203	474	551
Total polyphenols (eq-g tannic acid/kg DM)	7.3	12.7	7.2	66
Condensed tannins (CT) (eq-g CT/kg DM) ²				
Total CT	1.5	1.8	10.5	76.6
Extractable CT	0.4	0.9	7.3	72.2
Protein-bound CT	0.7	0.6	2	2.5
Fiber-bound CT	0.3	0.3	1.1	2

¹ Concentrate with 10% quebracho; ² in forages expressed as sainfoin CT equivalents; in the concentrates expressed as quebracho CT equivalents.

3.1. Effect of the type of forage on *in vitro* fermentation.

The type of forage (hay vs. fresh forage) had major effects on most of the *in vitro* fermentation parameters (Table 2). The hay-based diets produced more gas ($P < 0.05$) and tended to produce more CH₄ ($P < 0.10$) than the fresh forage-based diets. The type of forage also affected the IVOMD ($P < 0.001$) and the NH₃-N content ($P < 0.01$), recording lower values in hay-based diets than in fresh forage-based diets. The total VFA was not affected by type of forage ($P > 0.05$), but the individual VFA proportions varied according to the forage with lower acetic ($P < 0.10$) and propionic acid proportions ($P = 0.01$) but greater proportions of butyric ($P < 0.01$), valeric ($P < 0.001$), and branched chain VFA (BCVFA) ($P < 0.001$) in the fresh forage-based diets than in the hay-based diets. The type of forage did not affect the C₂:C₃ ratio ($P > 0.05$) but affected the CH₄/VFA_{total} ratio ($P < 0.05$), with the hay-based diets presenting lower ratios than the fresh forage-based diets.

3.2. Hay-based diets: Effect of the inclusion of the control or quebracho concentrate.

The fermentation parameters are shown in Table 2, and the fermentation kinetics during the incubation of the hay-based diets is represented in Figure 1. Gas and CH₄ production and NH₃-N content were not affected by the inclusion of concentrate, regardless the presence of quebracho ($P > 0.05$). However, the parameters of the kinetics of fermentation were differently affected depending on the presence of quebracho. The potential gas production decreased only with the inclusion of quebracho concentrate ($P < 0.05$). There rate of gas production c tended to increase with the inclusion of the control concentrate ($P < 0.10$), whereas it increased with the inclusion of quebracho concentrate ($P < 0.01$). Further, the inclusion of concentrate improved the IVOMD to a greater extent with quebracho concentrate ($P < 0.05$), and a tendency was only observed with the inclusion of the control concentrate ($P < 0.10$). The inclusion of concentrates affected most of the molar proportions of VFA ($P < 0.05$) but not total VFA production ($P > 0.05$). The inclusion of both concentrates similarly reduced the proportions of propionic and iso-valeric acids ($P < 0.01$) and tended to reduce the proportion of iso-butyric acid ($P < 0.10$) but increased butyric acid ($P < 0.05$). The C₂:C₃ ratio increased when concentrate was added to a greater extent with the control concentrate ($P < 0.01$) than with the quebracho concentrate ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of the type of forage and the inclusion of control or quebracho concentrate on gas and CH₄ production, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), NH₃-N, and volatile fatty acids (VFA) after 24 h of incubation.

	Substrates ¹						RMSE ²	Contrast				
	H	FF	HC	HQ	FFC	FFQ		Hs vs. FFs ³	H vs. HC	H vs. HQ	FF vs. FFC	FF vs. FFQ
pH	6.65	6.61	6.67	6.69	6.69	6.77	0.14	0.81	0.88	0.73	0.51	0.19
Total gas production (mL/g dOM ⁴)	181	150	191	172	175	163	14	0.013	0.42	0.43	0.04	0.27
Potential gas production (<i>A</i>) (mL)	61.9	42.7	47.8	42.1	49.1	47.8	10.4	0.42	0.12	0.04	0.47	0.56
Rate of gas production (<i>c</i>) (h ⁻¹)	0.06	0.12	0.11	0.14	0.13	0.13	0.03	0.06	0.06	0.005	0.84	0.82
Total CH ₄ production (mL/g dOM ⁴)	21.2	17.8	23.1	20.5	21.6	19.8	2	0.08	0.26	0.69	0.03	0.23
CH ₄ /gas (mL/L)	169	231	256	228	258	235	30	0.12	0.004	0.03	0.28	0.88
IVOMD (g/kg)	498	668	554	582	703	723	37.7	<0.001	0.097	0.02	0.28	0.099
NH ₃ -N (mg/L)	105	134	87	91	118	103	16	0.007	0.2	0.31	0.23	0.03
Total VFA (mmol/L)	58.5	62.7	63.5	61	61.3	59	5.49	0.99	0.29	0.59	0.75	0.42
Acetic acid (C ₂) (mmol/mol)	684	678	697	693	682	679	11.34	0.06	0.18	0.33	0.7	0.94
Propionic acid (C ₃) (mmol/mol)	159	142	142	145	138	143	5.23	0.01	0.002	0.008	0.41	0.85
Butyric acid (mmol/mol)	98	109	109	111	118	119	5.93	0.007	0.04	0.03	0.098	0.06
Valeric acid (mmol/mol)	14.9	17.6	14.1	13.5	16.7	15.4	1.05	<0.001	0.35	0.11	0.33	0.02
Iso-butyric acid (mmol/mol)	15.4	18	13.7	13.8	16	15.8	0.98	<0.001	0.06	0.06	0.03	0.02
Iso-valeric acid (mmol/mol)	28.9	35.2	24.1	23.9	29.4	28	1.94	<0.001	0.011	0.009	0.003	0.001
C ₂ :C ₃ ratio (mol/mol)	4.33	4.79	4.94	4.8	4.93	4.76	0.23	0.22	0.006	0.03	0.47	0.86
CH ₄ /VFA _{total} (mL/mmol)	1.53	1.57	1.72	1.67	2.03	1.84	0.13	0.02	0.1	0.22	0.001	0.03

¹H: 100% hay; FF: 100% fresh forage; HC: 70% hay:30% control concentrate; HQ: 70% hay:30% quebracho concentrate; FFC: 70% fresh forage:30% control concentrate; FFQ: 70% fresh forage:30% quebracho concentrate.

²Root mean standard error.

³Hs vs. FFs: H, HC, and HQ vs. FF, FFC, and FFQ.

⁴degraded organic matter.

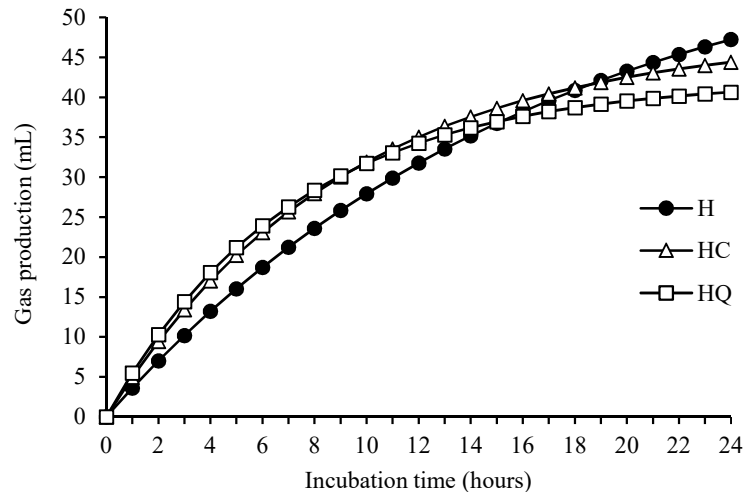


Figure 1. Fermentation kinetics of the hay-based diets during 24 hours of incubation.

H: 100% hay; HC: 70% hay:30% control concentrate; HQ: 70% hay:30% quebracho concentrate.

3.3. Fresh forage-based diet: Effect of the inclusion of control or quebracho concentrate.

The parameters obtained in the *in vitro* fermentation are shown in Table 2, and the fermentation kinetics during the incubation is represented in Figure 2. The inclusion of the control concentrate increased the production of total gas and CH₄ ($P < 0.05$) without affecting IVOMD and NH₃-N ($P > 0.05$). However, the inclusion of quebracho concentrate did not affect the production of gas and CH₄ ($P > 0.05$) but tended to increase IVOMD ($P < 0.10$) and reduce NH₃-N content ($P < 0.05$). The total VFA and the proportions of acetic and propionic acids were not affected by the inclusion of concentrate ($P > 0.05$). The inclusion of both concentrates tended to increase the proportion of butyric acid ($P < 0.10$) and reduce the proportions of BCVFA ($P < 0.05$ to $P < 0.001$). The proportion of valeric acid was only affected by the inclusion of quebracho concentrate ($P < 0.05$). The CH₄/VFA_{total} ratio increased to a greater extent with the control ($P < 0.001$) than with quebracho concentrate inclusion ($P < 0.05$).

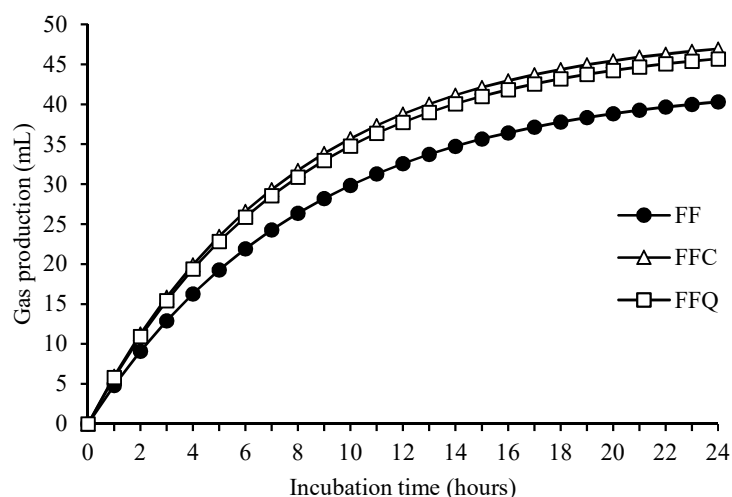


Figure 2. Fermentation kinetics of the fresh forage-based diets during 24 hours of incubation.

FF: 100% fresh forage; FFC: 70% fresh forage:30% control concentrate; FFQ: 70% fresh forage:30% quebracho concentrate.

4. DISCUSSION.

4.1. Effects of the type of forage on fermentation parameters.

In the present study, the forages for the fresh and hay diets were harvested at different stages of maturity in an attempt to use the forages actually offered to ewes in dry mountainous areas. As stated above, ewes are fed hay-based diets indoors when natural resources are scarce or they graze when the pasture is available. Usually, farmers harvest the forage for haymaking when maximum production is possible, with the forage near maturity, and turn out the ewes to the meadows at the start of the grazing season, when forages are in the vegetative stage. Therefore, these two forages, either consumed as hay or fresh, may have different ruminal fermentation characteristics, which may be reflected in different productive performances (Lobón *et al.*, 2017b; Lobón *et al.*, 2019a).

One of the most important objectives of nutrition is to improve microbial efficiency, thus maximizing feed conversion into microbial biomass, improving microbial protein supply to the small intestine, and, proportionally, reducing energy losses (Beever *et al.*, 1993). In the present study, the lower gas and CH₄ production and greater IVOMD of fresh forage-based compared with hay-based diets were due to the lower content of structural carbohydrates of the former than the latter (Calabrò *et al.*, 2005; Beauchemin *et al.*, 2008). These results might indicate that the organic matter degraded in fresh forage-based diets is mainly destined for microbial biomass synthesis (Mauricio *et al.*, 2001;

Guglielmelli *et al.*, 2011). Furthermore, the increase of *c* in fresh forage-based diets could be related to a higher content of rapidly fermentable carbohydrates (Calabrò *et al.*, 2005), showing a fast fermentation process allowing high voluntary intake (Cushnahan and Gordon, 1995). Thus, fresh forage-based diets showed a more favorable ruminal fermentation path for animal production because there were lower energetic losses, lower methane production, and greater degradability of the feedstuffs (Johnson and Johnson, 1995; Guglielmelli *et al.*, 2011).

In the current experiment, ammonia content and the proportions of valeric, iso-butyric, and iso-valeric acids, which derive from the fermentation of protein and branched-chain amino acids, reflected the CP content of the forages (Guglielmelli *et al.*, 2011; Saro *et al.*, 2014). Generally, the presence of structural carbohydrates is associated with the production of acetic and butyric acids to the detriment of propionic acid (Getachew *et al.*, 1998; Calabrò *et al.*, 2005), which did not occur in the present study. However, as in the current experiment, Saro *et al.* (2014) reported that diets with a higher concentration of fiber had higher proportions of acetic and propionic acids, a lower proportion of butyric acid, and a similar C₂:C₃ ratio than diets with a lower concentration of fiber under *in vivo* conditions until 8 h postfeeding.

4.2. Effect of the inclusion of concentrate with or without quebracho.

In suckling lamb production systems, concentrates are offered to ewes to cover the high requirements of lactation (Ripoll-Bosch *et al.*, 2014b) because there is an increase of dietary energy and, thereby, an optimization of the efficiency of feed utilization (Morand-Fehr and Sauvant, 1987). Occasionally, CT from quebracho can be included in the concentrate to promote the rumen fermentation towards a more efficient ruminal fermentation (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat and Benchaar, 2013; Jayanegara *et al.*, 2015a). In the current experiment, the concentration of condensed tannins from quebracho was limited to 75 g/kg DM in the concentrate because greater contents lead to postprandial aversion and lesions in digestive tracts (Hervás *et al.*, 2003b). However, the final dose in the 70:30 forage:concentrate diets was 22.5 g/kg DM of CT from quebracho.

The inclusion of concentrate is associated with an increase of the gas production (Kumar *et al.*, 2013; Serment *et al.*, 2016) mainly due to increasing the amount of energy available to the microbial population during the first hours of incubation (Sommart *et al.*, 2000). In the current experiment, this effect was more noticeable in the first hours of

incubation of hay-based diets (Figure 1). However, the effect at 24 h was only evident with the inclusion of the control concentrate in the fresh forage diet. The absence of the effect of the inclusion of concentrate at the end of incubation in hay-based diets agrees with Zicarelli *et al.* (2011), who observed similar gas production with the inclusion of 30% concentrate in a diet with oat hay. The inclusion of quebracho concentrate had no effect on gas production with respect to forage alone, as reported with the addition of 30 g/kg DM of quebracho extract in a silage-based diet (67:33 forage:concentrate) (Castro-Montoya *et al.*, 2018). Similarly, the inclusion of 20 g/kg DM CT from quebracho in a total mixed ration had no effect on gas production (Hassanat and Benchaar, 2013).

As with gas production, CH₄ production increased only with the inclusion of control concentrate in the fresh-pasture diet, agreeing with Pedreira *et al.* (2013), who recorded an increase of CH₄ production with sorghum silage supplemented with 30% of concentrate. The similar methane production with the inclusion of quebracho concentrate in the fresh forage diet could be due to the presence of CT that counterbalanced the presence of rapidly fermentable carbohydrates in the concentrate, which accelerated the degradation process and increased bacterial growth (Van Milgen *et al.*, 1993; Arbabi *et al.*, 2017) during the short incubation in the present study. Similar to the current experiment, the inclusion of 20 g/kg DM CT from quebracho in a total mixed ration had no effect on CH₄ production (Hassanat and Benchaar, 2013).

In the current experiment, the inclusion of concentrates increased the IVOMD in the hay-based diet, as has been reported for low-quality forages (Zicarelli *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013). Surprisingly, the inclusion of quebracho concentrate increased the IVOMD, whereas a higher dose of quebracho CT extract (30 g/kg DM) reduced the IVOMD of alfalfa hay-based diets (Castro-Montoya *et al.*, 2018) due to the linkage with molecules of the feed (Mueller-Harvey, 2006). Thus, the high content of nonstructural carbohydrates of the quebracho concentrate could have contributed to improving the IVOMD.

In the current experiment, the inclusion of concentrates did not affect NH₃-N content in the hay-based diets, with low CP content, in agreement with other authors (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat and Benchaar, 2013). The effect of the inclusion of concentrate on NH₃-N production varied according to the presence of quebracho in the fresh forage diet. The similar NH₃-N concentration of the control concentrate when

compared to the forage alone agrees with Archimède *et al.* (1996), who included 30% and 60% of concentrate in alfalfa hay-based diets with a high protein content. However, the inclusion of quebracho concentrate reduced the $\text{NH}_3\text{-N}$ content, as reported by Castro-Montoya *et al.* (2018), who observed the reduction of $\text{NH}_3\text{-N}$ content with the inclusion of 15 g/kg DM of quebracho. This reduction could be associated with a reduction of protein degradation due to the presence of CT (Mueller-Harvey, 2006).

Results showed that neither the inclusion of concentrate nor the addition of quebracho affected the total VFA production, according to previous studies that used similar proportions of the concentrate (Zicarelli *et al.*, 2011; Pedreira *et al.*, 2013) and a similar inclusion of quebracho (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat and Benchaar, 2013). Most works in the literature report no effect or a reduction of $\text{C}_2\text{:C}_3$ due to the increase of the propionic proportion (Archimède *et al.*, 1996; Zicarelli *et al.*, 2011; Hassanat and Benchaar, 2013; Pedreira *et al.*, 2013), with greater inclusion of concentrate and quebracho than the ones used in the present experiment. The low inclusion of CT from quebracho in the current experiment did not reduce the $\text{C}_2\text{:C}_3$ ratio, as it was reported in previous studies (Hassanat and Benchaar, 2013; Castro-Montoya *et al.*, 2018). The reduction of the proportion of valeric acid with the inclusion of quebracho concentrate in the forage-based diet and the BCVFA with the inclusion of concentrates in both forages agrees with enhancement of the microbial capture of these VFA due to the energetic input from the concentrates (Wegner and Foster, 1963; Serment *et al.*, 2016). Furthermore, the presence of CT can increase the utilization of BCVFA for microbial protein synthesis (Martínez *et al.*, 2006) and/or can reduce protein degradation in the rumen (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat and Benchaar, 2013; Castro-Montoya *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONS.

In conclusion, fresh forage-based diets had more efficient fermentation due to lower gas and CH_4 production and higher IVOMD than hay-based diets. The inclusion of concentrates, regardless of the presence of quebracho, affected to a greater extent the hay-based diets than the fresh forage-based diets due to the differences in the quality. It would be advisable to include CT from quebracho at a low dose (22.5 g CT/kg DM in diets) in both forages because it had minor but relevant effects on the fermentation parameters, as it reduced protein degradation in fresh forage-based diets and improved the efficiency of fermentation in hay-based diets.

Capítulo 2

Methane production of fresh sainfoin, with or without PEG, and fresh alfalfa at different stages of maturity is similar but the fermentation end products vary

Pablo J. Rufino-Moya, Mireia Blanco, Juan Ramón Bertolín and Margalida Joy

Animals 2019, 9: 197

SIMPLE SUMMARY.

In the last years, there has been increasing interest in the use of forages containing condensed tannins (CT) in ruminant nutrition. Condensed tannins can reduce the methane emissions and the ruminal degradation of protein, improving the animal performances to different extents depending on the source and dose of CT. *In vitro* fermentation of sainfoin has not been studied in fresh forage. The effect of CT can be studied in comparison with a similar CT-free forage or using polyethylene glycol (PEG), which is a tannin-blocking agent. The maturity stage influences the chemical composition to a different degree depending on the legume species, and can affect the content and fractions of CT. The aims of this trial were to compare the fermentation parameters of sainfoin with or without PEG, to detect the differences due to CT, at different maturity stages (vegetative, start-flowering, and end-flowering) and compare them with the fermentation parameters of alfalfa. The main results were that sainfoin had greater *in vitro* organic matter degradability (IVOMD) and lower ammonia and acetic:propionic ratio than alfalfa. Sainfoin CT had effect on ammonia and individual fatty acid proportions. In conclusion, fermentation end products were affected both by the chemical composition and CT contents.

ABSTRACT.

Alfalfa and sainfoin are high-quality forages with different condensed tannins (CT) content, which can be affected by the stage of maturity. To study the effects of CT on fermentation parameters, three substrates (alfalfa, sainfoin, and sainfoin+PEG) at three stages of maturity were *in vitro* incubated for 72 h. Sainfoin had greater total polyphenol and CT contents than alfalfa. As maturity advanced, CT contents in sainfoin decreased ($P < 0.05$), except for the protein-bound CT fraction ($P > 0.05$). The total gas and methane production was affected neither by the substrate nor by the stage of maturity ($P > 0.05$). Overall, sainfoin and sainfoin+PEG had greater *in vitro* organic matter degradability (IVOMD) than alfalfa ($P < 0.05$). Alfalfa and sainfoin+PEG presented higher ammonia content than sainfoin ($P < 0.001$). Total volatile fatty acid (VFA) production was only affected by the stage of maturity ($P < 0.05$), and the individual VFA proportions were affected by the substrate and the stage of maturity ($P < 0.001$). In conclusion, alfalfa and sainfoin only differed in the IVOMD and the fermentation end products. Moreover, CT

reduced ammonia production and the ratio methane:VFA_{total}, but the IVOMD was reduced only in the vegetative stage.

Keywords:

Polyethylene glycol; gas production; *in vitro* organic matter degradability; condensed tannins; ammonia; volatile fatty acid; *in vitro* assay.

1. INTRODUCTION.

There is increasing interest in legume-based forage production systems because of their low reliance on fertilizer nitrogen, potential environmental benefits, and high protein content that contribute to low-input and sustainable livestock production systems (Phelan *et al.*, 2015). Alfalfa (*Medicago sativa L.*) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) are two pluriannual legumes widely grown in the Mediterranean area, presenting high forage productive capacity, high nutritional value, and restorative action for soil fertility (Delgado *et al.*, 2014). However, alfalfa has a low content of polyphenols and is considered virtually free of condensed tannins (CT), whereas sainfoin presents a high content of polyphenols and a medium to high content of CT (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011a; Toral *et al.*, 2016).

Alfalfa is usually fed as hay to ruminants mainly to avoid bloat, although continuous grazing is possible without bloat incidence both in sheep (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2010) and growing cattle (Blanco *et al.*, 2011). Thus, the majority of studies that compared the ruminal fermentation of alfalfa and sainfoin have been performed using hays (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012; Toral *et al.*, 2016). The differences between alfalfa and sainfoin have been ascribed to differences in the chemical compositions (Toral *et al.*, 2016), but also to the presence of CT (Calabrò *et al.*, 2012). To clarify whether the differences between alfalfa and sainfoin are only due to CT, polyethylene glycol (PEG) must be added as a tannin-blocking agent (Calabrò *et al.*, 2012). To the best of our knowledge, the ruminal fermentation of both species was compared in fresh forages only by McMahon *et al.* (1999) and Chung *et al.* (2013). Depending on their content, characteristics, and properties (Hatew *et al.*, 2016), CT from sainfoin alter both the breakdown of protein in the rumen to ammonia and methane, gas and the production of total volatile fatty acids (VFA) (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b; Toral *et al.*, 2016). These, in turn, are associated with the

variety, stage of maturity, and environmental factors (Azuhwi *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011a; Hatew *et al.*, 2015).

The objectives of this trial were to compare the *in vitro* fermentation of alfalfa and sainfoin at three stages of maturity and to clarify whether the differences between both legumes were due to the CTs of sainfoin using PEG.

2. MATERIAL AND METHODS.

2.1. Experimental design.

Three substrates (alfalfa, sainfoin, and sainfoin+PEG) at three stages of maturity (vegetative, start-flowering, and end-flowering) were used to evaluate the effect of sainfoin CTs on *in vitro* fermentation. Alfalfa was used as a tannin-free legume.

2.2. Animal and diets.

2.2.1. Forages, crop management and harvest.

The experiment was performed at the CITA Research Institute at Zaragoza (41°42' N, 0°49' W), altitude 216 m a.s.l., located in Ebro Valley, north-eastern Spain. The silt loam soil at the site had pH 8.1 and 1.81% organic matter and contained 16% clay, 53.5% silt, and 30.5% sand. Alfalfa and sainfoin were cultivated and managed as described by Lobón *et al.* (2019a). Samples of forage were collected fortnightly from 14 April to 22 September 2015. The stage of maturity of the sainfoin and alfalfa was classified into vegetative, start-flowering, and end-flowering according to Borreani *et al.* (2003) and Kalu and Fick (1981), respectively. In each sampling, 10 samples per legume were obtained from 0.25 m² areas randomly allocated in the plot. These samples were mixed homogeneously, and a part of the sample was separated manually into stems, leaves, and flowers to study their respective percentages. Another part of the samples was dried at 60 °C for 48 h for chemical analyses, and the rest of the sample was freeze-dried in a Genesis Freeze Dryer 25 (Hucoa Erlöss, SA/Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) for polyphenol and CT analyses and *in vitro* fermentation assays. Samples for the chemical analyses were ground and sieved through a 1-mm screen (Rotary Mill, ZM200 Retsch, Haan, Germany), and a part of the samples was ground and sieved through a 0.2-mm screen for crude protein (CP), polyphenol, and CT determination. All the samples were stored at -20 °C in total darkness.

The number of samples of vegetative, start-flowering and end-flowering stages of each forage to study the *in vitro* fermentation were chosen in concordance with the representativeness of the plant development. The vegetative stage was the most frequent stage (55%), followed by end-flowering (27%) and start-flowering (18%) stages. Three samples of the vegetative stage and two samples of the start- and end-flowering of each legume species were studied.

2.2.2. Animals and sampling of ruminal digesta.

The procedures used in the trial followed the Spanish guidelines for experimental animal protection (RD 53/2013) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Research Centre (Procedure number 2011-05). Rasa Aragonesa wethers (n = 4; Live weight: 65 ± 2.1 kg) were used as donors of ruminal content. The management of the rumen-cannulated wethers and the sampling of the ruminal digesta was made as reported in Rufino-Moya *et al.* (2019). Briefly, wethers were fed a diet composed by alfalfa hay (70%) and barley grain (30%) at energy maintenance level. Before morning feeding, ruminal digesta from each wether was collected into a prewarmed insulated thermo, individually strained through four layers of cheesecloth and homogenized. Rumen fluid from the four wethers was mixed (pH: 6.76 ± 0.099), and a buffer solution was added in a proportion of 1:2 (v/v) based on the protocol of Menke and Steingass (1988).

2.2.3. In vitro gas production technique and sampling.

The production of gas was measured with the Ankom system (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, USA), which had 310 mL capacity bottles fitted with pressure and temperature sensors. The valve open time was one second, the threshold for gas release was 5 PSI and the bottles were not shaken. Five hundred mg of freeze-dried substrate (alfalfa, sainfoin, or sainfoin+PEG) were incubated with 60 mL of buffered solution:rumen fluid (2:1 v/v) in a water bath (at 39 °C) for 72 h. To make the sainfoin+PEG samples, PEG-4000 (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the buffered rumen fluid at a concentration of 2.3 g/L [12]. Four runs were conducted on four separate days, and each sample was incubated in duplicate in each run. Gas production and corrected with the blanks (two bottles without substrate were included in each run).

After 72 h of incubation, the bottles were placed in ice to stop fermentation (5-10 min), and then tempered (at room temperature for 10-15 min). A sample of the gas produced was transferred (at atmospheric pressure) with a syringe attached to a manometer into a Vacutainer® tube to determine CH₄ and conserved at 4 °C until analysis. At the end of gas sampling, the pH was measured immediately with a microPH 2002 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). The sampling to determine ammonia (NH₃-N) content and VFA were carried out as reported in Rufino-Moya *et al.* (2019). Briefly, to determine the ammonia content, 2.5 mL of liquid was mixed with 2.5 mL HCl 0.1 N. For VFA determination, 0.5 mL of the liquid was added to 0.5 mL of deproteinizing solution and 1 mL of distilled water. Tubes with samples for determination of ammonia and VFAs were stored at -20 °C until future analyses. The entire incubated sample was filtered through a preweighed bag (50 µm; Ankom) to estimate the *in vitro* organic matter degradability (IVOMD). Briefly, the bags were sealed, washed, dried at 103 °C for 48 h, and finally, placed in a muffle at 550 °C to obtain the ashes. The organic matter of the bag content was obtained as DM-ashes, and the IVOMD was calculated.

2.3. Analytical methods.

2.3.1. Chemical composition.

All the analyses of the chemical composition were analyzed as reported in Rufino-Moya *et al.* (2019) according to official methods. Briefly, AOAC methods were used to determine the contents of dry matter (index no. 934.01), ash (index no. 942.05), and CP (index no. 968.06) (AOAC, 2000). Neutral detergent fiber (NDFom), acid detergent fiber (ADFom), and lignin (sa) contents were determined according to the method described by Van Soest *et al.* (1991) using the Ankom 200/220 fiber analyzer (Ankom Technology Corporation). The NDFom was assayed with a heat stable amylase. The lignin (sa) was analyzed in ADF residues by the solubilization of cellulose with sulfuric acid. All the values were corrected for ash-free content. The ether extract (EE) was determined following the approved procedure Am 5-04 (AOCS, 2005) using an XT10 Ankom extractor (Ankom Technology Corporation). The nonstructural carbohydrates (NSC) were calculated as $NSC = 1000 - CP - EE - NDF - ash$, according to Guglielmelli *et al.* (2011).

The content of total polyphenol (TP) and the fractions of CT were determined as described in Rufino-Moya *et al.* (2019). Briefly, the TP were extracted using the method

of Makkar (2000) and were quantified following the method of Julkunen-Tiitto (1985). The extractable CT (ECT), protein-bound CT (PBCT), and fiber-bound CT (FBCT) were extracted and fractioned following the method of Terrill *et al.* (1992b) and quantified by the colorimetric HCl-butanol method described by Grabber *et al.* (2013). The standard used for the quantification was extracted and purified from sainfoin using the method described by Wolfe *et al.* (2008). An Heλios β spectrophotometer was used to measure the samples and standard calibration at 725 nm for TP and at 550 nm for TC.

2.3.2. Determination of parameters of the *in vitro* gas production technique.

Gas production, recorded hourly for 72 h, was used to estimate the parameters of the kinetics of fermentation adjusting the gas produced to the model described by France *et al.* (2000):

$$p = A \times (1 - e^{-ct})$$

where p is the cumulative gas production (mL) at time t (h), A is the potential gas production (mL), and c is the rate of gas production (h^{-1}).

An HP-4890 (Agilent, St. Clara, CA, USA) gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID) and a TG-BOND Q+ capillary column (30 m \times 0.32 mm i.d. \times 10 μm film thickness, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used to determine CH_4 . Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was maintained at 100 °C (isothermal program). The splitless injection volume was 200 μL . Methane identification was based on the retention time compared with the standard. The methane concentration was calculated from the peak concentration:area ratio using the peak area generated from standard gas as the reference (CH_4 ; 99.995% purity [C45], Carbueros Metálicos, Barcelona, Spain).

The content of ammonia was measured in Epoch microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using a colorimetric method described by Chaney and Marbach (1962).

A Bruker Scion 460 GC (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped with CP-8400 autosampler, FID and a BR-SWax capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness, Bruker) was used to determine the concentration of acetic, propionic, isobutyric, butyric, iso-valeric, and valeric acids. Helium was the carrier gas (flow rate of 1 mL/min). The oven temperature program was 100 °C, followed by a 6 °C/min increase to

160 °C. The injection volume was 1 µL at a split ratio of 1:50. The individual VFA were identified based on retention time comparisons with commercially available standards of acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, valeric, and 4-methyl-valeric acids at ≥ 99% purity (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.4. Statistical analyses.

Data were analyzed using SAS v. 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The fermentation kinetic parameters (A and c) were estimated using a nonlinear regression model (NLIN procedure). The contents of secondary compounds were analyzed using the GLM procedure with the substrate, the stage of maturity and its interaction as fixed effects. Total gas and CH₄ production, A , c , IVOMD and the fermentation end products were analyzed using mixed models considering the substrate, the stage of maturity and its interaction as fixed effects and the run as random effect. If the interaction was not significant, it was deleted from the model and the analysis was repeated. The least square means, their associated standard errors and the differences were obtained. Pearson correlation coefficients between variables were calculated using the CORR procedure. For the entire test, the effects were considered a significant probability at a value of $P < 0.05$ or a trend at $P < 0.10$.

3. RESULTS.

3.1. Chemical composition.

The chemical composition and the percentage of stems, leaves, and flowers of both legume species at the three stages of maturity are shown in Table 1. On average, alfalfa and sainfoin had similar ADFom (231 g/kg DM), CP (198 g/kg DM), EE (15 g/kg DM), and NSC (335 g/kg DM) contents. Alfalfa, however, had higher ash and NDFom contents and a lower lignin (sa) content than sainfoin. For both forages, NDFom and ADFom content increased as the stage of maturity progressed, whereas the CP content decreased. As the forage matured, the lignin (sa) content increased only in alfalfa whereas the contents of EE and NSC decreased only in sainfoin.

Alfalfa and sainfoin had similar proportions of leaves (51.9 vs. 53.6%). However, alfalfa had a greater proportion of stems (45.2 vs. 39.7%) and a lower proportion of flowers (2.8 vs. 6.7%) than sainfoin. Regarding the stage of maturity, the proportion of

stems and flowers increased, whereas the proportion of leaves decreased as the stage of maturity advanced.

Table 1. Chemical composition and plant components of alfalfa and sainfoin at three stages of maturity.

Item	Alfalfa			Vegetative	Sainfoin	
	VEG	Start-Flowering	End-Flowering		Start-Flowering	End-Flowering
<u>Chemical composition</u>						
Dry Matter (DM) (g/kg)	249	261	333	241	262	224
Ash (g/kg DM)	103	111	98	83	113	82
CP ¹ (g/kg DM)	227	207	166	204	201	181
NDFom ² (g/kg DM)	336	352	405	313	324	394
ADFom ³ (g/kg DM)	201	230	276	199	213	264
Lignin (sa), (g/kg DM)	45	53	66	78	76	76
Ether extract (g/kg DM)	18	10	16	22	15	11
NSC ⁴ (g/kg DM)	317	320	316	379	347	332
<u>Plant components (%)</u>						
Leaves	59.3	53.7	42.7	66.3	56	38.5
Stems	40.7	43.7	51.3	33.7	40.8	44.6
Flowers	0	2.5	5.9	0	3.2	16.8

¹ crude protein; ² Neutral detergent fiber; ³ acid detergent fiber; ⁴ nonstructural carbohydrates.

3.2. Contents of total polyphenols and condensed tannins.

The content of total polyphenols and the total (TCT) and fractions of CT were affected by the interaction between the legume species and the stage of maturity ($P < 0.05$) (Figure 1). Alfalfa presented steady contents of total polyphenols, TCT, ECT, PBCT, and FBCT, which were lower than those of sainfoin ($P < 0.001$) regardless of the stage of maturity. The contents of polyphenols, TCT, ECT, and FBCT decreased as maturity advanced ($P < 0.05$).

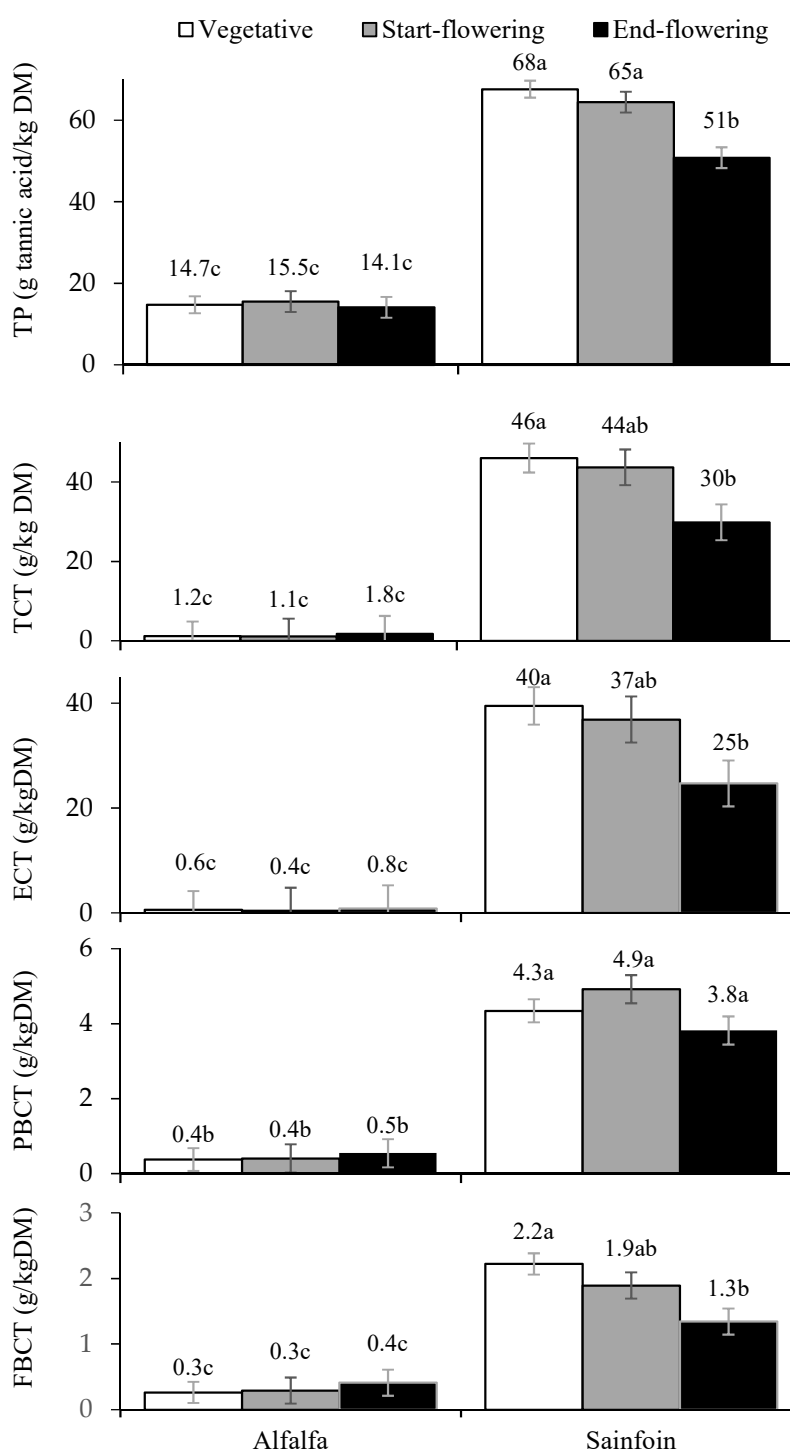


Figure 1. Effect of the species and the stage of maturity on the contents of total polyphenols (TP), total condensed tannins (TCT), extractable CT (ECT), protein-bound CT (PBCT), and fiber-bound (FBCT). Within a parameter, means with different letter differ at $P < 0.05$. (Within each species: $n = 3$ for the vegetative stage, $n = 2$ for the start-flowering, and $n = 2$ for the end-flowering stages).

3.3. *In vitro* fermentation.

The pH was affected by the interaction between the substrate and the stage of maturity ($P < 0.01$; Table 2). Alfalfa had greater pH than sainfoin and sainfoin+PEG ($P < 0.05$). Sainfoin and sainfoin+PEG were affected similarly by the stage of maturity ($P < 0.001$), with the greatest pH value in the vegetative stage ($P < 0.05$). Total gas and CH₄ production were affected neither by the substrate nor by the stage of maturity ($P > 0.05$; Table 2). However, the interaction between the substrate and the stage of maturity affected A ($P < 0.001$) and c ($P = 0.05$). Alfalfa showed lower A values at start-and end-flowering stages ($P < 0.001$) and greater c in the vegetative and start-flowering stages ($P < 0.05$) than sainfoin and sainfoin+PEG ($P < 0.05$). Regarding the effect stage of maturity, sainfoin and sainfoin+PEG had the lowest A values in the vegetative stage ($P < 0.05$). As the stage of maturity progressed, c increased in sainfoin and sainfoin+PEG substrates ($P < 0.05$).

The IVOMD was also affected by the interaction between the substrate and the stage of maturity ($P < 0.001$; Table 2). Alfalfa had lower IVOMD than both sainfoin substrates in the start-flowering and end-flowering stages ($P < 0.05$), whereas sainfoin+PEG had greater IVOMD than alfalfa and sainfoin in the vegetative stage ($P < 0.05$). In alfalfa, the IVOMD decreased as the stage of maturity advanced ($P < 0.05$). The sainfoin and sainfoin+PEG showed the greatest IVOMD in the start-flowering stage ($P < 0.05$). The IVOMD was correlated with A ($r = 0.60$; $P < 0.01$) and with the total VFA production ($r = 0.51$; $P < 0.05$).

The NH₃-N content was only affected by the substrate ($P < 0.001$); sainfoin produced a lower NH₃-N concentration than alfalfa and sainfoin+PEG (Table 2). In contrast, total VFA production was only affected by the stage of maturity ($P < 0.05$), the start-flowering stage presented greater VFA production than the rest of the stages (105, 99, and 100 mmol/L for start-flowering, vegetative, and end-flowering, respectively). Regarding the individual VFAs, alfalfa had a lower acetic acid proportion and greater proportions of the rest of the individual VFAs than sainfoin ($P < 0.001$). When comparing both sainfoin substrates, sainfoin had a greater acetic acid proportion and lower proportions of the rest of the VFAs than sainfoin+PEG ($P < 0.001$). Sainfoin presented the greatest C₂:C₃ ratio, followed by sainfoin+PEG and alfalfa, which had the lowest ratio ($P < 0.001$). Regarding the effect of the stage of maturity, the vegetative stage had a lower proportion of acetic

acid and greater proportions of propionic, iso-butyric, and iso-valeric acid than the rest of stages of maturity ($P < 0.001$). The vegetative stage had a lower C₂:C₃ ratio than the other stages ($P < 0.001$). The CH₄:VFA_{total} ratio was only affected by the substrate ($P = 0.01$); sainfoin+PEG presented a greater CH₄:VFA_{total} ratio than the other substrates ($P < 0.05$).

4. DISCUSSION.

In Mediterranean areas, there is an increasing interest to reintroduce forage-based systems in ovine production to ensure the viability and sustainability of the farms. Legumes are especially advisable due to their nutritional quality for ruminants and environmental benefits (Phelan *et al.*, 2015). Moreover, the presence of CT in some legumes may decrease CH₄ production and improve the performance of ovine to different extents depending on the source and dose of CT. As these legumes are usually fed conserved, either as silage or as hay, there is scarce information on the fermentation parameters when alfalfa and sainfoin are offered fresh. Previous experiments showed differences between the fermentation parameters of alfalfa and sainfoin hay and silage (Toral *et al.*, 2016; Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017), however, it is not clear if the differences were due to the chemical composition, the presence of CT in sainfoin or both. With the present study, the fermentation parameters of alfalfa and sainfoin, with or without PEG, in fresh at different stages of maturity were compared to try to clarify the origin of the differences in fermentation. The use of gas production technique is a good tool to evaluate the effect of CT on fermentation parameters, but the fermentation is influenced by the time of incubation, species of the animal donor and the diet (Frutos *et al.*, 2004b; Martínez *et al.*, 2006). Furthermore, the effects of sainfoin CT vary according the variety, harvest time, and cultivation site (Azuhwi *et al.*, 2011; Hatew *et al.*, 2015), making it difficult to compare the results with other studies. In the present study, the content of total CT and their fractions were analyzed, however, the chemical characteristics of CT (molecular weight, degree of polymerization, prodelphinidin/procyanidin ratio, *cis/trans* ratio, etc.) were not evaluated.

Table 2. Effect of the substrate (S) and the stage of maturity (SM) on gas and methane production (CH₄), potential gas production (*A*), rate of gas production (*c*), *in vitro* organic matter degradability (IVOMD), ammonia (NH₃-N), and volatile fatty acids (VFA).

Item	Alfalfa			Sainfoin			Sainfoin+PEG			r.s.d. ²	<i>P</i> -Values		
	VEG	Start-F	End-F	VEG	Start-F	End-F	VEG	Start-F	End-F		S	SM	SxSM
pH	6.42 ^a	6.44 ^a	6.41 ^a	6.35 ^{bx}	6.32 ^{by}	6.33 ^{by}	6.37 ^{bx}	6.31 ^{bz}	6.34 ^{by}	0.032	<0.001	0.002	0.01
Gas production (mL/g dOM ³)	179	184	188	183	163	181	180	199	173	26.5	0.43	0.97	0.12
<i>A</i> (mL)	68 ^x	67 ^{bx}	62 ^y	63 ^y	74 ^{bx}	70 ^x	65 ^y	78 ^{ax}	67 ^y	5.7	0.01	<0.001	<0.001
<i>c</i> (h ⁻¹)	0.2 ^a	0.22 ^a	0.19	0.14 ^{by}	0.16 ^{bx}	0.19 ^y	0.15 ^{bx}	0.15 ^{bx}	0.19 ^y	0.037	<0.001	0.02	0.05
CH ₄ production (mL/g dOM ³)	37	38	39	37	33	38	37	39	36	5.0	0.29	0.73	0.17
CH ₄ : gas (mL/L)	145	142	141	14 ^{xy}	134 ^y	148 ^x	145	144	144	8.8	0.35	0.13	0.11
IVOMD (g/kg)	851 ^{bx}	837 ^{bx}	770 ^{by}	850 ^{by}	926 ^{ax}	856 ^{ay}	868 ^{ay}	936 ^{ax}	864 ^{ay}	16.9	<0.001	<0.001	<0.001
NH ₃ -N (mg/L)	240 ^a	247 ^a	210	206 ^b	184 ^b	201	242 ^a	234 ^a	215	31.7	<0.001	0.06	0.20
Total VFAs (mmol/L)	102 ^{xy}	105 ^x	97 ^y	96 ^y	103 ^x	101 ^{xy}	99 ^y	105 ^x	102 ^{xy}	7.1	0.61	0.02	0.35
Acetic acid (C ₂) (mol/100 mol)	63.1 ^{cy}	63.9 ^{bx}	64.0 ^{bx}	65.4 ^{ay}	66.5 ^{ax}	66.3 ^{ax}	63.9 ^{by}	64.6 ^{bx}	64.5 ^{bx}	0.76	<0.001	<0.001	0.95
Propionic acid (C ₃) (mol/100 mol)	15.5 ^a	15.3 ^a	15.3 ^a	15 ^{bx}	14.5 ^{cy}	14.5 ^{by}	15.3 ^{ax}	14.9 ^{by}	15.2 ^{ax}	0.28	<0.001	<0.001	0.09
Butyric acid (mol/100 mol)	13.0 ^a	12.6 ^a	12.6 ^a	12.1 ^c	12.2 ^b	12 ^b	12.5 ^b	12.8 ^a	12.4 ^a	0.45	<0.001	0.20	0.16
Iso-butyric acid (mol/100 mol)	1.97 ^{ax}	1.91 ^{axy}	1.87 ^{ay}	1.82 ^{bx}	1.68 ^{by}	1.72 ^{by}	1.97 ^{ax}	1.83 ^{ay}	1.84 ^{ay}	0.100	<0.001	<0.001	0.63
Valeric acid (mol/100 mol)	2.14 ^{axy}	2.09 ^{ay}	2.22 ^{ax}	1.87 ^{bx}	1.7 ^{cy}	1.83 ^{cx}	2.12 ^{ay}	1.95 ^{bx}	2.04 ^{by}	0.107	<0.001	<0.001	0.11
Iso-valeric acid (mol/100 mol)	4.27 ^{ax}	4.09 ^{axy}	4.04 ^{ay}	3.87 ^{bx}	3.5 ^{by}	3.65 ^{by}	4.19 ^{ax}	3.91 ^{ay}	3.93 ^{ay}	0.223	<0.001	<0.001	0.69
C ₂ :C ₃ (mol/mol)	4.1 ^{cy}	4.18 ^{cxy}	4.2 ^{bx}	4.39 ^{ay}	4.62 ^{ax}	4.59 ^{ax}	4.18 ^{by}	4.36 ^{bx}	4.25 ^{by}	0.109	<0.001	<0.001	0.13
CH ₄ :VFA _{total} (mL/mol)	2.41	2.24 ^b	2.35	2.53	2.22 ^b	2.48	2.62	2.73 ^a	2.4	0.313	0.01	0.26	0.10

¹ VEG: vegetative; Start-F: start of flowering; End-F: end of flowering.

² residual standard deviation.

³ degraded organic matter.

Within a parameter, means with different superscript (a,b,c) differ at $P < 0.05$ for the substrate effect in each stage of maturity.

Within a parameter, means with different superscripts (x,y,z) at $P < 0.05$ for the stage of maturity effect in each substrate.

4.1. Effect of the substrate.

References showed noticeable variability in the chemical composition of alfalfa and sainfoin among studies, which is related to the stage at harvest, leaf:stem ratio, soil characteristics, weather conditions, and the cultivars utilized (Azuhwi *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011a; Hatew *et al.*, 2015). In the present study, the similar CP and ADF contents and different NDF contents of alfalfa and sainfoin agree partially with the results reported by Chung *et al.* (2013), who observed similar NDF, ADF and CP contents in fresh alfalfa and sainfoin at the late vegetative stage. However, at the early vegetative stage, the same authors observed greater NDF and ADF contents in alfalfa than sainfoin and similar CP contents.

Alfalfa has a low content of total polyphenols and is considered a CT-free legume Theodoridou *et al.* (2011a), although it may present very low CT content in the seed coats. Therefore, the present results related to the presence of CT agree with previous studies that analyzed both legumes offered fresh (Tavendale *et al.*, 2005; Scharenberg *et al.*, 2007a) or as preserved forages (Toral *et al.*, 2016; Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017).

The pH did not negatively affect the fermentation environment because the values were within the range of 6.2 to 6.8 and these values ensure a favorable environment for the activity of cellulolytic bacteria (Doane *et al.*, 1997). The inclusion of PEG in the current experiment did not affect pH, as reported in fresh sainfoin (Theodoridou *et al.*, 2011b) and sainfoin hay (Calabrò *et al.*, 2012). Regarding gas production, the similar production of alfalfa and sainfoin agrees with the similar gas production observed in alfalfa and sainfoin leaves incubated in Rusitec units (McMahon *et al.*, 1999) and alfalfa and sainfoin silages (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). However, when alfalfa and sainfoin hays were studied, differences in gas production were reported (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012; Toral *et al.*, 2016). The inconsistency of the results of the type of substrate on gas production might be related to the differences in chemical composition, the different characteristics of CT and of type and settings of the *in vitro* assay (Hatew *et al.*, 2015). In that sense, the similar gas production between sainfoin and sainfoin+PEG was unexpected because previous experiments reported increases in gas production when PEG was added to fresh sainfoin (Theodoridou *et al.*, 2011b; Hatew *et al.*, 2015). According to Azuhwi *et al.* (2011), the inclusion of PEG increased gas production by 2.7 to 9.6%, depending on the sainfoin variety, site, and stage at harvest. In the current

experiment, the inclusion of PEG slightly increased the gas production, although not statistically significantly.

The similar CH₄ production of alfalfa and sainfoin recorded in the present study agrees with results reported using fresh forages (Chung *et al.*, 2013) and silages (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). However, the inclusion of extracts from sainfoin accessions in alfalfa decreased CH₄ production, but the effect was greatly dependent on the accession and the dose of inclusion (Hatew *et al.*, 2016). Moderate CT content may have beneficial effects reducing rumen CH₄ emission production (Bodas *et al.*, 2012). The action of CT on methanogenesis can be attributed to indirect effects via reduced hydrogen production (and presumably reduced forage digestibility) and via direct inhibitory effects on methanogens (Tavendale *et al.*, 2005). Regarding the effect of PEG, the inclusion of PEG in sainfoin did not affect CH₄ production in previous studies (Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012) as in the current experiment. The structural features of condensed tannins affect *in vitro* CH₄ production, which may be linked to the interaction of CT with dietary substrate or microbial cells (Hatew *et al.*, 2016; Huyen *et al.*, 2016). Therefore, the type of CT and dose present in the current experiment might not be sufficient to modify CH₄ production.

The reduced *A* in alfalfa compared with sainfoin and sainfoin+PEG in the start- and end-flowering stages can be related to the higher fiber fraction, as reported by Guglielmelli *et al.* (2011). In the current experiment, the presence of CT in sainfoin had no effect on *A*, as reported by Calabrò *et al.* (2012). The higher *c* in alfalfa when compared to sainfoin agrees with the results reported by Hatew *et al.* (2016), although the effect on *c* depends on the types and concentrations of sainfoin CT.

The lower IVOMD of alfalfa, when compared to sainfoin and sainfoin+PEG, was also reported using fresh forage estimated *in situ* (Chung *et al.*, 2013) and *in vitro* (Lobón *et al.*, 2015) and could be related to the greater fiber fraction. The increased IVOMD in sainfoin+PEG with respect to sainfoin at the vegetative stage could be related to the blockage of CT by the PEG. However, Theodoridou *et al.* (2011b) reported no effect of the inclusion of PEG in sainfoin on IVOMD studied at 24 h, regardless of the stage of maturity. The discrepancy between studies could be related to the content, characteristics and structures of CTs, which depends on the botanical species and variety of the source (Azuhwi *et al.*, 2011; Hatew *et al.*, 2015).

The NH₃-N contents recorded in the present study are in line with most similar studies that compared alfalfa and sainfoin (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b; Toral *et al.*, 2016). The reduced NH₃-N concentration in sainfoin with respect to alfalfa and sainfoin+PEG confirmed the inhibition elicited by CTs in the ruminal degradation of dietary proteins due to the formation of complexes CT-protein at ruminal pH (Mueller-Harvey, 2006). In contrast, the effect of CT on total VFA production is not clear. Some studies reported a lower total VFA production in sainfoin silage than in alfalfa silage (Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017), and the inclusion of different doses of extracted accession of sainfoin in alfalfa decreased or maintained the total VFA production, depending on the accession (Hatew *et al.*, 2016). In the current experiment, the total VFA production was not affected by the legume species, as observed by other authors (Chung *et al.*, 2013; Toral *et al.*, 2016). The inclusion of PEG did not affect total VFA production in the current experiment as reported for sainfoin hay (Calabrò *et al.*, 2012; Niderkorn *et al.*, 2012), which is contrary to the increase of total VFA production observed by Hatew *et al.* (2015). The differences between the studies could be due to the time of incubation, species of the animal donor, chemical structure, and biological activity of CT (Frutos *et al.*, 2004b; Hatew *et al.*, 2015).

Generally, the presence of CT from sainfoin leads to an increase in the propionic acid proportion and a reduction in the C₂:C₃ ratio (Chung *et al.*, 2013; Hatew *et al.*, 2016; Huyen *et al.*, 2016). However, the effect on each individual VFA proportion is variable due to the type of substrate, types, and contents of CT and length of incubation period or the donor animal (Frutos *et al.*, 2004b; Hatew *et al.*, 2016). In the present study, sainfoin had a greater acetic acid proportion than alfalfa, which was similar to results from Guglielmelli *et al.* (2011) using hays and Grosse-Brinkhaus *et al.* (2017) using silages. The C₂:C₃ ratio recorded in the present study was greater in sainfoin than in alfalfa and sainfoin+PEG, which is in contrast with other studies that did not observe effects of the type of substrate or the addition of PEG (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b; Niderkorn *et al.*, 2012). Sainfoin had lower valeric acid and branched-chain VFA proportions than alfalfa and sainfoin+PEG because of the presence of CTs (Huyen *et al.*, 2016; Toral *et al.*, 2016; Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). Condensed tannins reduce the proportions of branched-chain VFA due to reduce protein degradation in the rumen because these VFA are products of the breakdown of the carbon skeleton of amino acids during rumen fermentation (Hassanat and Benchaar, 2013).

4.2. Effect of the stage of maturity.

The decrease in CP content and the concomitant increase in the cell wall (NDFom and ADFom) content as the stage of maturity progressed in both forages is a result of the decrease of the proportion of leaves to stems and the increase of lignified tissues (Chung *et al.*, 2013). The steady lignin (sa) content in sainfoin during the development of plants can be due to some interference between this compound and CT during analysis, as reported by Guglielmelli *et al.* (2011).

In the current experiment, the TP and TCT contents were affected by the stage of maturity, as reported in previous studies (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011a; Theodoridou *et al.*, 2012), although the magnitude of the effect varied among the studies. Regarding the CT fractions, there is little information about the influence of the stage of maturity. As in the present study, Chung *et al.* (2013) observed a reduction of the ECT fraction in the end-flowering stage with respect to the vegetative stage in sainfoin. However, Jin *et al.* (2012) observed greater TCT, ECT, and PBCT contents in *Dalea purpurea* at flowering than at the vegetative stage due to the high percentage of flowers, which are very rich in CT (Piluzza and Bullitta, 2010). From a physiological point of view, the reduction in the secondary compound concentrations as maturity advances could be due to a sort of dilution as a consequence of the growth and expansion of plant cells (Joseph *et al.*, 1998) and to the decrease in the leaf:stem ratio as a consequence of the reduction of leaves, which are rich in CT (Piluzza and Bullitta, 2010).

The lack of an effect of the stage of maturity on pH values in alfalfa agrees with the results reported by Chung *et al.* (2013), but the reduction of pH in sainfoin at both flowering stages disagrees with the abovementioned study. In this sense, the stage of maturity had no effect on pH when sainfoin hay was incubated (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012). More studies considering the stage of maturity, the chemical composition and the presence of secondary compounds in alfalfa and sainfoin must be performed to discern the importance of these factors on the ruminal pH.

Previous studies reported a reduction of *in vitro* gas and CH₄ production as the stage of maturity advanced, associated with the chemical composition and the CT content (Bal *et al.*, 2006; Theodoridou *et al.*, 2011b). However, the stage of maturity had no effect on gas and CH₄ production in the current experiment, which is in agreement with *in vitro* (Guglielmelli *et al.*, 2011) and *in vivo* (Chung *et al.*, 2013) experiments. The similar

chemical composition observed between stages of maturity, the low biological activity of CT and the interactions between nutritive components and antinutritional factors could be responsible for the similar gas and CH₄ production (Guglielmelli *et al.*, 2011).

As expected, the IVOMD of alfalfa decreased as the fiber fraction increased with maturity (Navarro-Villa *et al.*, 2011). In contrast, sainfoin, with or without PEG, presented considerably high IVOMD at the start-flowering stage with respect to the rest of the stages in agreement with Theodoridou *et al.* (2011b). These results could be due to the different biological activity of CT at vegetative and start-flowering stages (Theodoridou *et al.*, 2011a), because the chemical composition and CT contents were similar in both stages.

The advancing of the stage of maturity tended to reduce NH₃-N production as a consequence of the decrease of CP content in concordance with several studies carried out *in vitro* (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b) and *in vivo* (Theodoridou *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013). Studies concerning the effect of the stage of maturity on the total production of VFA and their proportions show discrepancies. The chemical composition of the substrates, the length of the incubation period, and the inoculum donor animal are determinant factors that can influence VFA production and proportions (Frutos *et al.*, 2004b). In the current experiment, the start-flowering stage presented the highest total VFA production, in concordance with the highest IVOMD observed. However, Theodoridou *et al.* (2011b) studied the effect of the stage of maturity of fresh sainfoin with a similar CT content in a 24 h *in vitro* assay and did not find an effect on the total VFA production.

In relation to the proportion of individual VFA, the effect of the stage of maturity on these parameters has been reported *in vitro* and *in vivo* in previous studies (Guglielmelli *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013), but the results are not consistent. In the current experiment, as maturity advances, there is an increase in acetic acid and a decrease in propionic acid proportions, thus increasing the C₂:C₃ ratio due probably to increase of fiber and reduction of CT content (Theodoridou *et al.*, 2012). The reduction of the proportion of iso-butyric and iso-valeric acids in the start- and end-flowering stages and valeric acid at the start-flowering stage in comparison with the vegetative stage might be explained by the decrease in CP content, because they are products of the breakdown of

the carbon skeleton of amino acids during rumen fermentation, as the maturity of the forage advanced (Navarro-Villa *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013).

5. CONCLUSIONS.

In conclusion, sainfoin might be an alternative to alfalfa due to the high IVOMD and the potential protection against ruminal protein degradation, according to the results of ammonia content, branched-chain VFA, and valeric acid proportion from sainfoin *in vitro*. The effect of the stage of maturity was less than expected, probably due to the high quality of the forages. It is required to study the effects of the type of substrate and stage of maturity on animal performance to recommend the best stage of maturity to cut sainfoin and alfalfa.

Capítulo 3

Effect of the method of preservation on the chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics in two legumes rich in condensed tannins

Pablo J. Rufino-Moya, Mireia Blanco, Juan Ramón Bertolín and Margalida Joy

Animal Feed Science and Technology 2019, 251: 12-20

ABSTRACT.

The objective of the present study was to evaluate the effects of preservation (hay and silage) on the chemical composition and the *in vitro* fermentation characteristics in comparison with fresh forage in two legumes rich in condensed tannins (CT). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) was collected at the late bloom stage and sulla (*Hedysarum coronarium*) at the early bloom stage. In each forage, a part was immediately freeze-dried, a part was dried at ambient temperature to obtain hay, and another part was ensiled in vacuum-packages for 82 days. An *in vitro* assay to study the fermentation was carried out with an Ankom system during 72 h. In both forages, the silages had different contents of polyphenols and condensed tannins fractions than fresh forage and hay ($P < 0.05$). Sainfoin hay only had greater content of fibre-bound CT fraction (FBCT) than fresh sainfoin, whereas sulla hay had greater protein-bound CT and FBCT contents than fresh sulla ($P < 0.05$). Sainfoin silage had lower gas and methane production than hay and fresh forage ($P < 0.001$), whereas fresh sulla had greater gas and methane production, followed by hay and silage, which produced the least ($P < 0.05$). In both legumes, hay had lower *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) than silage and fresh forage ($P < 0.001$). The method of preservation affected the total production of volatile fatty acids (VFA) only in sulla ($P < 0.05$). Most of the proportions of individual VFA were affected by the method of preservation in both legumes ($P < 0.001$). In conclusion, polyphenols content, total content and fractions of CT were more affected in the silages than in the hays when compared to fresh forages. However, according to gas and methane production and IVOMD, silage may have greater feed nutritive value than hay although further studies on animal performance are warranted before recommendation.

Keywords:

Sainfoin; sulla; condensed tannins; gas production; hay; silage.

1. INTRODUCTION.

The interest in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and sulla (*Hedysarum coronarium*), which are two perennial legumes extensively used in the Mediterranean area, has increased due to their content of condensed tannins (CT), which have a positive effect on the reduction of methane production in the rumen (Waghorn and Clark, 2006; Bodas *et al.*, 2012; Hatew *et al.*, 2016). Both legumes have high productive capacity (15

and 25 t DM/ ha, respectively), high nutritional value and medium to high CT content (50-80 g/kg DM) (Waghorn *et al.*, 1998). However, these legumes have differences in the fractions of extractable CT (ECT), protein bound-CT (PBCT) and fibre bound-CT (FBCT), which influence the bioactivity of the CT (Jonker and Yu, 2017).

It is advisable to preserve these forages to optimize their use for animal feeding because two-thirds of the annual production of these forages is obtained in the first spring cut (Delgado *et al.*, 2008). Preservation can increase the fibrous fraction, reduce the crude protein (CP) (Dentinho *et al.*, 2006; Aufrère *et al.*, 2008) and change the fractions of CT (Wang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). Nevertheless, the extent of the effects is dependent on the method of preservation, silage or hay and the legume species (Scharenberg *et al.*, 2007a).

Condensed tannins reduce microbial action, gas and methane (CH₄) production and ammonia (NH₃-N) content (Frutos *et al.*, 2004a; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005b; Jonker and Yu, 2017), depending on the species of CT-containing legume (Huyen *et al.*, 2016; Grosse-Brinkhaus *et al.*, 2017). To the best of our knowledge, the effects of preservation on ruminal fermentation have been scarcely studied in sainfoin (Scharenberg *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2015) and sulla (Dentinho *et al.*, 2006).

The hypothesis of the experiment was that the type of preservation affects the presence of CT and the fermentation in these two species, however, the extent of the effect is unknown. The aim of this study was to assess the effect of the method of preservation (hay vs. silage) on the chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics and compare them with fresh forage in two CT-containing legume species: sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and sulla (*Hedysarum coronarium*).

2. MATERIALS AND METHODS.

2.1. Animal and diets.

2.1.1. Experimental design.

The current experiment evaluated a single factor with multiple levels (fresh forage, hay and silage) in two CT-containing legumes, sainfoin and sulla. The forages are analysed separately because they differ in the phenological stage at sampling (see below).

2.1.2. Forages.

Two legumes were grown at CITA Research Institute at Zaragoza (41° 42' N, 0° 49' W), altitude 216 m a.s.l., annual mean temperature of 15 ± 7.3 °C and annual average rainfall of 296 ± 78 mm, Ebro Valley, north-eastern Spain). The silt-loam soil at the site had pH 8.1 and 1.81% organic matter (OM) and contained 16% clay, 53.5% silt and 30.5% sand. No mineral fertilizer was applied. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* cv *Reznos*) and sulla (*Hedysarum coronarium* cv *Carmen*) were sown each in a paddock in autumn 2013 at seeding rates of 100 kg/ha and 20 kg/ha, respectively. Each paddock was divided in 3 plots of 50 x 30 m. During spring, irrigation was applied every 15-21 days.

2.1.3. Harvest and preservation of the forages.

Samples of sainfoin were collected the 7th May 2015 at the late bloom stage, and samples of sulla were collected the 21st April 2015 at the early bloom stage. Ten samples were obtained from 0.25 m² areas randomly allocated in each plot. Then, the 10 samples from each plot were mixed homogeneously and divided into three samples for fresh forage, hay and silage.

The samples destined to make hay were extended in 10-cm elevated “mosquito” nets for 16 days. The samples were naturally sun-dried, however, they were dried indoors under unfavourable climatic conditions. The samples destined to make silage were wilted one day, chopped (3-5 cm) and vacuum-ensiled in plastic bags (2 kg/bag). The plastic bags were protected from light and were kept at room temperature.

Part of the samples of fresh forage, hay and silage were dried in an oven at 60 °C for 48 h and the other part was immediately freeze-dried. Part of the oven- and the freeze-dried samples was ground and sieved through a 1 mm screen (Rotary Mill, ZM200 Retsch, Haan, Germany) whereas another part through a 0.2 mm screen. All the samples were stored in total darkness at – 20 °C temperature until further analyses.

2.1.4. Animals and sampling of ruminal digesta.

All the procedures used in the experiment were carried out in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (RD 53/2013) with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Research Centre (Procedure number 2011-05).

Four Rasa Aragonesa wethers (65 ± 2.1 kg body weight) fitted with rumen cannula were used as donors of ruminal contents. The animals were housed in individual pens (150 cm x 150 cm) with free access to water and a mineral-vitamin mixture. Wethers were fed a 70:30 mixed diet of alfalfa hay:barley grain at energy maintenance levels, distributed in two equal meals at 8:00 h and 13:00 h. The diet had 913, 168, 426 and 269 g/kg of organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDFom) and acid detergent fibre (ADFom), respectively. The day of the assay, before the morning feeding, ruminal digesta from each wether was collected into a pre-warmed (39 °C) insulated thermos and transported to the laboratory, which was located next to the animal facilities. Rumen digesta was individually strained through four layers of cheesecloth and homogenized. Rumen fluid from the four wethers was mixed, and a buffer solution was added based on the protocol of Menke and Steingass (1988) in a proportion of 1:2 (v/v).

2.1.5. In vitro gas production technique and sampling.

Gas production was determined with the Ankom system (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, USA), which consists of 310 mL capacity bottles fitted with pressure and temperature sensors. The freeze-dried samples (500 mg) were incubated with 60 mL of buffered solution:rumen fluid (2:1 v/v) in a water bath at 39 °C for 72 h. Three runs were conducted on three separate days, and each sample was incubated in duplicate in each run. Two bottles without substrate were used as negative controls (blanks). Gas production was recorded for 72 h and was corrected with the blanks.

After 72 h of incubation, the bottles were placed for 5-10 minutes in ice to stop fermentation. Then, the bottles were tempered at room temperature for 10-15 minutes. A sample of gas was collected from each bottle at atmospheric pressure with a syringe attached to a manometer into a Vacutainer® tube. The tubes were conserved at 4 °C until CH₄ determination. At the end of gas sampling, the pH of the fermentation liquid was measured immediately with a microPH 2002 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). To determine the ammonia (NH₃-N) content in the fermentation fluid, 2.5 mL of liquid was mixed with HCl 0.1 N in a proportion of 1:1 (v/v). For volatile fatty acid (VFA) determination, 0.5 mL of liquid was added to 0.5 mL of deproteinizing solution [5 mL of 85% (v/v) ortho-phosphoric acid and 0.125 mL of 4-methylvaleric acid (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) as internal standard, dissolved in 250 mL of distilled water] and 1

mL of distilled water. Tubes with samples of NH₃-N and VFA were stored at -20 °C until future analyses.

2.2. Analytical methods.

2.2.1. Chemical composition.

All the analyses of the chemical composition were run in duplicate. The dry matter (DM) (index no. 934.01) and ash (index no. 942.05) contents of the feedstuffs were determined in oven-dried samples according to the AOAC methods (AOAC, 2000). The content of CP (Nitrogen x 6.25) was determined following the Dumas Procedure (index no.968.06) using a nitrogen analyser (Model NA 2100, CE Instruments, Thermoquest SA, Barcelona, Spain) (AOAC, 2000). Neutral detergent fibre (NDFom), acid detergent fibre (ADFom), and acid detergent lignin (lignin (sa)) contents were determined according to the method described by Van Soest *et al.* (1991) using the Ankom 200/220 fibre analyser (Ankom Technology Corporation). The NDFom from forages was assayed with a heat stable amylase. The lignin (sa) was analysed on ADFom residues by solubilization of cellulose with sulphuric acid. All values were corrected for ash-free content.

The total polyphenols were extracted in freeze-dried samples according to the method described by Makkar (2000) and quantified following the method of Julkunen-Tiitto (1985) using the tannic acid as standard. Samples and standard calibration were measured with a Helios β spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) at 725 nm, and polyphenol contents were expressed as tannic acid equivalents.

The extractable CT (ECT), protein-bound CT (PBCT) and fibre-bound CT (FBCT) were extracted in freeze-dried samples and fractioned following the method of Terrill *et al.* (1992b), and quantified by the colorimetric HCl-butanol method described by Grabber *et al.* (2013). The standard used for the quantification of the samples was extracted and purified from sainfoin using the method described by Wolfe *et al.* (2008). Finally, samples and standard calibration were measured with the Helios β spectrophotometer at 550 nm and CT concentrations were expressed as sainfoin CT equivalents, because they have the same main polymer (prodelphinidin).

2.2.2. Determination of parameters of the *in vitro* gas production technique.

To study the kinetics of fermentation, gas production was recorded hourly for 72 h using the Ankom system. The gas produced in batch cultures was adjusted to the model described by France *et al.* (2000):

$$p = A \times (1 - e^{-ct})$$

where p is the cumulative gas production (mL) at time (h), A is the potential of gas production (mL), and c is the rate of gas production (h^{-1}).

Methane was determined by an HP-4890 (Agilent, St. Clara, CA, USA) gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID) and a TG-BOND Q+ capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 10 μm film thickness, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was maintained at 100 °C (isothermal programme). The splitless injection volume was 200 μL . Methane identification was based on the retention time compared with the standard. The analysis time was 3 min (included equilibration time). Methane concentration was calculated from the peak concentration:area ratio, using the peak area generated from standard gas as the reference (CH_4 ; 99.995% purity [C45], Carbueros Metálicos, Barcelona, Spain).

The *in vitro* organic matter degradability (IVOMD), after 72 h of incubation, was estimated by filtering the content of the bottle through a pre-weighed bag (50 μm ; Ankom Technology Corporation). The bags with sample were washed twice with distilled water and were dried at 103 °C for 48 h to a constant weight to obtain the dry matter content. After 48 h, the bag content was weighed, and the sample was placed in a muffle at 550 °C to obtain the ashes. The organic matter of bag content was obtained as DM-ashes, and the IVOMD was calculated.

The content of $\text{NH}_3\text{-N}$ in the ruminal fluid was assessed using the Berthelot reaction (Chaney and Marbach, 1962). Ammonia was determined by the colorimetric method, and the chromophore was measured at 625 nm in an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

The concentrations of VFA: acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric and valeric acids were determined using a Bruker Scion 460 GC (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped with CP-8400 autosampler, FID and a BR-SWax capillary column (30 m

x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, Bruker, USA) using helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature programme was 100 °C, followed by a 6 °C/min increase to 160 °C. The injection volume was 1 µl at a split ratio of 1:50. The VFA were identified based on retention time comparisons with commercially available standards of acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, valeric and 4-methyl-valeric acids of ≥ 99% purity (Sigma-Aldrich).

2.3. Calculations and statistical analyses.

Data were analysed using SAS v.9.3 statistical software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The fermentation kinetic parameters (A and c) were estimated through a non-linear regression model using the SAS NLIN programme. The statistical analyses were run separately for each legume. The chemical composition and the contents of polyphenols and CT were tested by analyses of variance using the GLM procedure, considering the method of preservation (fresh, hay and silage) as a fixed effect. The following model was used:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

where Y_i is the chemical composition parameter, μ is the overall mean, T_i is the effect of preservation method and e is the error term.

The fermentation parameters (pH, gas, CH₄, NH₃-N, VFA, and IVOMD) and the fermentation kinetic parameters (A and c) were analysed with mixed models considering the method of preservation as fixed effect and the run as random effect according to:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + e_{ij}$$

where Y_{ij} is the *in vitro* fermentation parameter, μ is the overall mean, T_i is the effect of preservation method, R_j is the effect of run and e is the error term.

The LSM means and their associated standard errors and differences in between means were obtained. Pearson correlation coefficients between variables were calculated for each forage using the CORR procedure of SAS. The effects were considered significant at a probability value of $P < 0.05$.

3. RESULTS.

The forages were harvested in the optimum phenological stage for farmers, which differs between sainfoin and sulla. The results of sainfoin and sulla were not statistically compared because the phenological stage could be a confounding effect. Then, the results are presented separately for each forage.

3.1. Sainfoin.

The method of preservation affected all the parameters of the chemical composition ($P < 0.05$), except for the ash content ($P > 0.05$) (Table 1). Fresh sainfoin had greater CP ($P < 0.05$) and lower fibre contents ($P < 0.01$) than both preserved forages, which only presented differences in lignin content ($P < 0.05$). Regarding total polyphenols, TCT and CT-fractions, fresh forage and hay only differed in FBCT content ($P < 0.01$). In contrast, silage presented lower total polyphenols ($P < 0.001$), TCT ($P < 0.05$) and ECT ($P < 0.001$) contents and greater PBCT and FBCT ($P < 0.001$) contents than fresh forage and hay.

Table 1. Effect of the preservation method on the chemical composition, polyphenols and condensed tannins (CT) of Sainfoin.

Parameters	Fresh	Hay	Silage	s.e.m. ¹	P-value
Dry Matter (DM) (g/kg)	220 ^c	898 ^a	293 ^b	7.78	< 0.001
Ash (g/kg DM)	90	80	86	2.7	0.40
Crude Protein (CP) (g/kg DM)	182 ^a	170 ^b	168 ^b	1.79	0.03
NDFom (g/kg DM)	422 ^b	471 ^a	456 ^a	3.4	0.003
ADFom (g/kg DM)	278 ^b	338 ^a	332 ^a	3.5	< 0.001
Lignin (sa) (g/kg DM)	70 ^c	94 ^b	107 ^a	1	< 0.001
Total polyphenols (eq-g tannic acid/kg DM)	44.6 ^a	47.1 ^a	34.1 ^b	0.53	0.001
Condensed tannins					
Total (eq-g CT/kg DM)	38.6 ^a	42.2 ^a	33.2 ^b	0.91	0.02
Extractable (eq-g CT/kg DM)	31.6 ^a	32.6 ^a	8.2 ^b	0.88	< 0.001
Protein-bound (eq-g CT/kg DM)	5.3 ^b	7.3 ^b	17.0 ^a	0.46	< 0.001
Fiber-bound (eq-g CT/kg DM)	1.8 ^c	2.3 ^b	7.9 ^a	0.04	< 0.001

Within a parameter, means with different letter differ at $P < 0.05$.

¹standard error mean.

The parameters obtained in the *in vitro* fermentation are shown in Table 2, and the fermentation kinetics during the incubation is represented in Figure 1. Fresh forage had greater A and c than both preserved forages ($P < 0.001$). Total gas production was greater in hay, intermediate in fresh forage and lower in silage ($P < 0.05$). The CH_4 production was greater in fresh forage and hay than that in silage ($P < 0.01$). The IVOMD was greater in fresh forage and silage than that in hay ($P < 0.001$). The production of CH_4 was negatively correlated with the contents of PBCT and FBCT ($r = -0.76$ and $r = -0.75$; $P < 0.05$, respectively) and positively correlated with ECT content ($r = 0.72$; $P < 0.05$).

Table 2. Effect of the preservation on the pH, production of gas and methane (CH_4), the kinetics of fermentation, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), ammonia ($\text{NH}_3\text{-N}$) and volatile fatty acids (VFA) after 72 h of incubation of Sainfoin.

Parameters	Fresh	Hay	Silage	s.e.m. ¹	P -value
pH	6.6 ^b	6.64 ^a	6.65 ^a	0.034	0.01
Total gas production (mL/g dOM ²)	192 ^b	205 ^a	177 ^c	13.5	< 0.001
Potential gas production (A) (mL)	73 ^a	68 ^b	63 ^c	2.8	< 0.001
Rate of gas production (c) (h^{-1})	0.11 ^a	0.08 ^c	0.10 ^b	0.01	< 0.001
Total CH_4 production (mL/g dOM)	51 ^a	50 ^a	45 ^b	3.7	0.01
CH_4/gas (mL/L)	209 ^a	191 ^b	196 ^b	9.2	< 0.001
IVOMD (g/kg)	797 ^a	717 ^b	785 ^a	22.1	< 0.001
$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/L)	160	178	159	28.2	0.28
Total VFA (mmol/L)	84	78	82	6	0.19
Acetic acid (C_2) (mmol/mol)	664 ^a	667 ^a	656 ^b	4.6	< 0.001
Propionic acid (C_3) (mmol/mol)	155 ^b	154 ^b	167 ^a	2.9	< 0.001
Butyric acid (mmol/mol)	111 ^a	100 ^c	104 ^b	2.7	< 0.001
Valeric acid (mmol/mol)	16	17	17	1.2	0.15
Iso-butyric acid (mmol/mol)	18 ^c	25 ^a	19 ^b	0.6	< 0.001
Iso-valeric acid (mmol/mol)	36 ^b	37 ^a	37 ^a	0.9	0.03
$\text{C}_2:\text{C}_3$ ratio (mol/mol)	4.3 ^a	4.4 ^a	3.9 ^b	0.11	< 0.001
$\text{CH}_4/\text{VFA}_{\text{total}}$ (mL/mmol)	3.7 ^a	3.5 ^{ab}	3.3 ^b	0.34	0.05

Within a parameter, means with different letter differ at $P < 0.05$.

¹standard error mean; ² degraded organic matter.

The method of preservation did not affect the $\text{NH}_3\text{-N}$ content and total VFA production ($P > 0.05$), but affected most of the proportions of the individual VFA ($P < 0.05$). Fresh forage and hay had greater acetic acid and lower propionic acid proportions

and, consequently, greater C₂:C₃ ratios than silage ($P < 0.001$). Fresh forage had greater butyric acid and lower branched-chain VFA acid proportions than both preserved forages ($P < 0.001$). Hay had higher proportion of iso-butyric and lower butyric than silage ($P < 0.05$). Fresh forage had a greater CH₄/VFA_{total} ratio than silage ($P < 0.05$), presenting hay an intermediate ratio ($P > 0.05$).

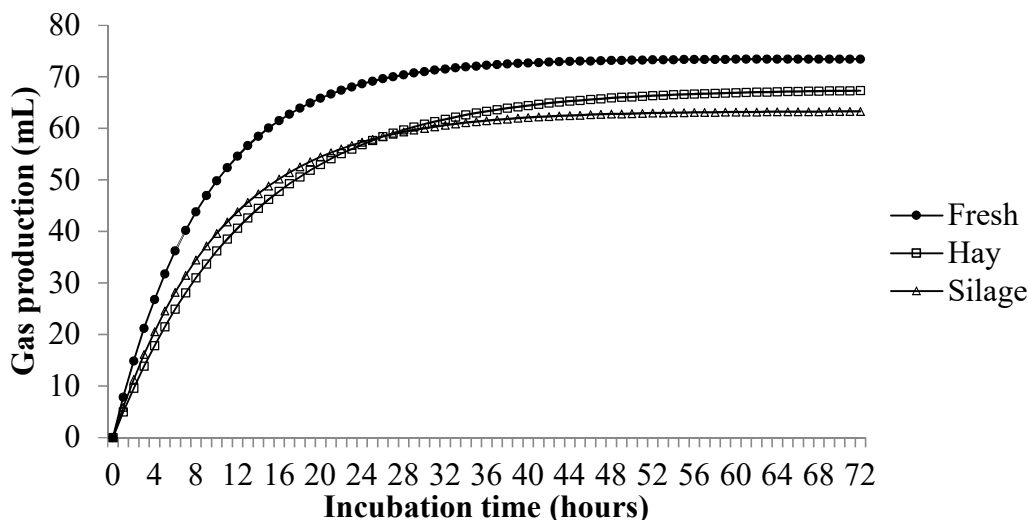


Figure 1. Effect of the conservation method on the fermentation kinetics during incubation of Sainfoin.

3.2. Sulla.

The method of preservation greatly affected the chemical composition, total polyphenols and CT contents in sulla (Table 3). Fresh forage had greater CP content and lower fibre content than both preserved forages ($P < 0.001$), which presented differences in fibre contents ($P < 0.001$). Regarding the content of total polyphenols, fresh forage had the greatest content, the hay intermediate and silage had the lowest content ($P < 0.001$). Fresh forage and hay had different contents of PBCT ($P < 0.05$) and FBCT ($P < 0.001$). Silage presented the lowest contents of TCT ($P < 0.01$) and ECT ($P < 0.001$), greatest FBCT ($P < 0.001$) and intermediate content of PBCT ($P > 0.05$) compared with fresh forage and hay.

The parameters obtained in the *in vitro* fermentation are shown in Table 4, and the fermentation kinetics during the incubation is shown in Figure 2. Fresh forage had greater total gas and CH₄ production, A , c and IVOMD than both preserved forages ($P < 0.001$). Hay produced more gas and CH₄ and had greater A but lower IVOMD than silage ($P < 0.05$) with similar c ($P > 0.05$). Gas production was correlated with the contents of ECT

($r = 0.80$, $P < 0.05$) and FBCT ($r = -0.82$, $P < 0.01$), whereas CH₄ production was correlated with the contents of TCT ($r = 0.70$, $P < 0.05$), ECT ($r = 0.89$, $P < 0.01$) and FBCT ($r = -0.90$, $P < 0.001$).

Table 3. Effect of preservation on chemical composition, polyphenols and condensed tannins (CT) of Sulla.

Parameters	Fresh	Hay	Silage	s.e.m. ¹	P-value
Dry Matter (DM) (g/kg)	130 ^c	839 ^a	144 ^b	0.6	< 0.001
Ash (g/kg DM)	127 ^c	145 ^b	176 ^a	0.3	< 0.001
Crude Protein (CP) (g/kg DM)	220 ^a	199 ^b	192 ^b	1.3	0.005
NDFom (g/kg DM)	347 ^c	409 ^b	483 ^a	1.5	< 0.001
ADFom (g/kg DM)	248 ^c	310 ^b	368 ^a	0.7	< 0.001
Lignin (sa) (g/kg DM)	54 ^c	90 ^b	122 ^a	0.8	< 0.001
Total polyphenols (eq-g tannic acid/kg DM)	33.7 ^a	28.4 ^b	20.5 ^c	0.44	0.001
Condensed tannins					
Total (eq-g CT/kg DM)	30.5 ^a	32.8 ^a	23.2 ^b	0.61	0.002
Extractable (eq-g CT/kg DM)	21.6 ^a	20.0 ^a	2.1 ^b	0.39	< 0.001
Protein-bound (eq-g CT/kg DM)	6.6 ^b	9.1 ^a	7.9 ^{ab}	0.26	0.02
Fiber-bound (eq-g CT/kg DM)	2.3 ^c	3.7 ^b	13.3 ^a	0.17	< 0.001

Means with a,b or c letter differ at $P < 0.05$.

¹standard error mean.

The method of preservation affected the total VFA ($P < 0.05$) and their proportions (Table 4; $P < 0.001$). The fresh forage and hay had greater total VFA and acetic acid proportions than the silage ($P < 0.05$). Fresh forage had the greatest propionic acid proportion, hay intermediate and silage the lowest ($P < 0.01$). Silage had greater proportions of butyric, valeric and iso-valeric acids than fresh forage and hay, which differed in the proportions of butyric and valeric acids ($P < 0.001$). The fresh forage presented the greatest CH₄/VFA_{total} ratio, the hay intermediate ratio, and the silage the lowest CH₄/VFA ratio ($P < 0.001$).

Table 4. Effect of the preservation on the pH, production of gas and methane (CH₄), the kinetics of fermentation, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), ammonia (NH₃-N) and volatile fatty acids (VFA) after 72 h of incubation of Sulla.

Parameters	Fresh	Hay	Silage	s.e.m. ¹	P-value
pH	6.64 ^b	6.68 ^a	6.70 ^a	0.032	0.002
Total gas production (mL/g dOM ²)	193 ^a	161 ^b	140 ^c	11.5	< 0.001
Potential gas production (<i>A</i>) (mL)	71 ^a	62 ^b	46 ^c	2.8	< 0.001
Rate of gas production (<i>c</i>) (h ⁻¹)	0.12 ^a	0.09 ^b	0.09 ^b	0.011	< 0.001
Total CH ₄ production (mL/g dOM)	46 ^a	41 ^b	34 ^c	3.2	< 0.001
CH ₄ /gas (mL/L)	188 ^a	188 ^a	172 ^b	12.3	< 0.001
IVOMD (g/kg)	853 ^a	788 ^c	822 ^b	18.3	< 0.001
NH ₃ -N (mg/L)	177	171	165	25.6	0.64
Total VFA (mmol/L)	83 ^a	82 ^a	78 ^b	3.6	0.02
Acetic acid (C ₂) (mmol/mol)	651 ^a	658 ^a	646 ^b	8	0.02
Propionic acid (C ₃) (mmol/mol)	159 ^a	154 ^b	139 ^c	4	< 0.001
Butyric acid (mmol/mol)	116 ^b	104 ^c	129 ^a	3.3	< 0.001
Valeric acid (mmol/mol)	18 ^c	19 ^b	22 ^a	1.3	< 0.001
Iso-butyric acid (mmol/mol)	19 ^c	27 ^a	22 ^b	0.8	< 0.001
Iso-valeric acid (mmol/mol)	38 ^b	39 ^b	41 ^a	1.9	0.001
C ₂ :C ₃ ratio (mol/mol)	4.1 ^c	4.3 ^b	4.7 ^a	0.16	< 0.001
CH ₄ /VFA _{total} (mL/mmol)	3.4 ^a	2.8 ^b	2.4 ^c	0.26	< 0.001

Within a parameter, means with different a, b or c superscript differ at *P* < 0.05.

¹standard error mean; ² degraded organic matter.

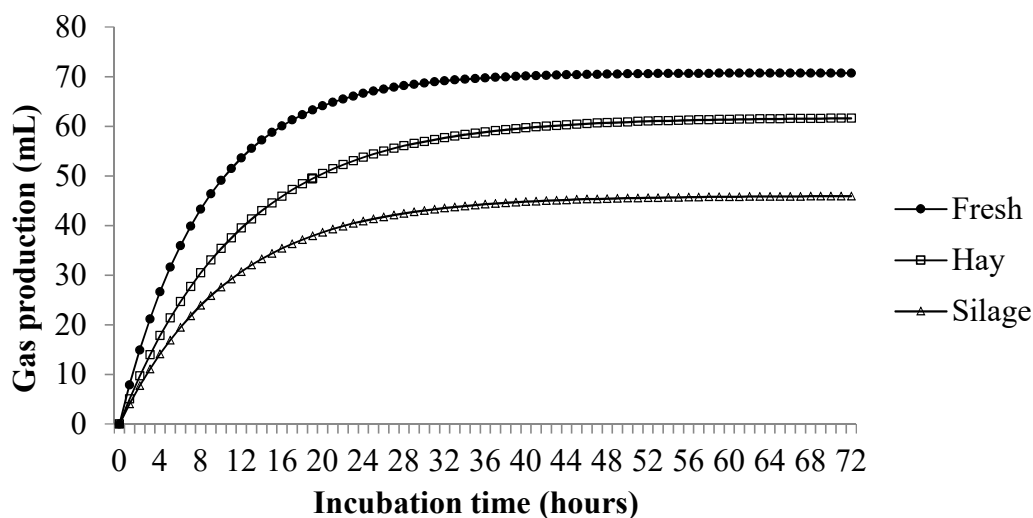


Figure 2. Effect of the conservation method on the fermentation kinetics during incubation of of Sulla.

4. DISCUSSION.

4.1. Chemical composition and secondary compounds.

The reduction of CP content might be associated with proteolysis, mainly during the drying process (Foster *et al.*, 2011), as extreme care was taken to avoid losses of leaves during the preparation of the samples. The different responses of NDFom and ADFom contents to hay and silage of the sainfoin and sulla could be partially ascribed to the different proportions of leaves and stems of both legumes (Waghorn *et al.*, 1998; Borreani *et al.*, 2003) and the different phenological stages of the legumes at harvest (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011a).

The decreased polyphenols and TCT contents due to ensiling could be due to a rupture of plant cells during chopping and crushing before ensiling, as reported in purple prairie clover (*Dalea purpurea*) by Huang *et al.* (2016). In that sense, hay and silage had similar TCT content when sainfoin was not chopped before ensiling (Scharenberg *et al.*, 2007a; Scharenberg *et al.*, 2007b). In the present study, the similar TCT contents of hay and fresh forage in both legumes agrees with the results reported from *Dalea purpurea* (Huang *et al.*, 2016), but is contrary to the reduction of TCT content observed in sainfoin by Aufrère *et al.* (2008), who ascribed this result to losses of leaves and/or sun exposure.

The noticeable reduction of ECT content of silage but the similar content of hay compared to fresh forage in both legumes agrees with the results reported in sainfoin (Wang *et al.*, 2015), *Dalea purpurea* (Huang *et al.*, 2016) and sulla (Minnee *et al.*, 2002). In silage, the reduction of ECT content is associated with an increase in the binding of CT to protein and/or fibre, mainly due to the reactions between the polyphenolic compounds and other plant molecules with the disruption of plant cells (Wang *et al.*, 2015). The fractions of CT had similar behaviour in both legume forages studied, except for PBCT in silage, which increased drastically in sainfoin but not in sulla. The increase in PBCT in hay with respect to fresh forage, although only numerical in sainfoin, agrees with the results reported from *Dalea Purpurea* (Huang *et al.*, 2016) but disagrees with the drastic decrease observed when sainfoin was dried with air forced at 30 °C (Scharenberg *et al.*, 2007a). The effect of preservation on CT fractions seems to be affected by several factors, such as the drying conditions (under warmed forced air), the phenological stage, the variety (Scharenberg *et al.*, 2007a; Lorenz *et al.*, 2010; Li *et al.*,

2014; Huang *et al.*, 2016) or the analytical procedure and the standards used to determine PBCT and FBCT contents (Makkar, 2003b; Frutos *et al.*, 2004a).

4.2. Production of gas and methane as well as IVOMD.

The effect of the preservation, which was greater for silage than for hay, on the gas and CH₄ production and on the IVOMD can be related to the change in fibre contents and CT fractions. According to Chaudhry and Khan (2012), the high content of fibre inhibits the proliferation of the rumen ciliates or protozoa, decreasing the methanogenic activity. However, the content of fibre in the current experiment was not that high. Then, the PBCT and FBCT contents could be a more plausible explanation of the changes observed as these fractions protect the protein and fibre from attack by microorganisms interfering with the proteolytic and fibrolytic activity of bacteria (McSweeney *et al.*, 2001a; Bodas *et al.*, 2012). Regarding the kinetics of fermentation, both methods of preservation reduced the *A* and *c* in both legume species, although the magnitude of the reduction depends on the fibre content and the fractions of CTs of each forage species (Kaplan, 2011; Saminathan *et al.*, 2015). The reduction of *A* and *c* in preserved forages could be due to a decrease of non-structural carbohydrates, more rapidly fermentable than fibre, as consequence of the plant metabolic processes registered during preservation (Romero-Huelva *et al.*, 2013).

It is well known that hays have lower IVOMD than fresh forages related to high fibre contents (Bal *et al.*, 2006; Kaplan, 2011), as was observed in the present study. Silage had lower IVOMD than fresh forage in sulla, which could be related to the more acute increase in the FBCT fraction in sulla silage. The OM degraded in the rumen has a double fate: gas and VFA production and microbial biomass synthesis (Mauricio *et al.*, 2001); thus, the decrease in gas production in both silages is advantageous to reduce the energy losses. Therefore, the higher IVOMD in silages than in hays, producing less gas and CH₄, may indicate that the degradation of OM was destined for microbial mass synthesis. However, the reduction of total gas and CH₄ production was associated with the reduction in IVOMD in hay in comparison with fresh forage.

4.3. Fermentation end-products.

In the current experiment, hay and silage in both legumes had similar CP and similar NH₃-N content and total VFA production as that reported when dried and silage

sainfoin was fed to lambs (Scharenberg *et al.*, 2007b). It could have been expected that the fresh and preserved forages that had different chemical compositions and CT contents and fractions had different NH₃-N contents and total VFA production. The reasons for these results remain unclear. On the one hand, the amplitude of the effect of CT on N degradation depends on the forage species, CT content and structure (Aufrère *et al.*, 2008). The contents of CT and the fractions studied in the current experiment did not explain the similar NH₃-N content. Other characteristics, such as the chemical characteristics of CT (molecular weight, degree of polymerisation, prodelphinidin/procyanidin ratio, *cis/trans* ratio...) or CP degradability and N linked to fibre, should be studied to elucidate the reasons for the absence of differences. Huang *et al.* (2016) observed greater CP degradation in silage than in hay or in the freeze-dried forage during the first hours of fermentation; however, at 72 h, the degradation was similar, which agrees with the results in the present study.

The effect of preservation on the proportions of VFA varied according to the legume species studied due to the different structural carbohydrate contents and to the concentration, structure and characteristics of CTs (Gray and Pilgrim, 1952; Theodoridou *et al.*, 2011b). In sainfoin, the increase in propionic acid of silage that concomitantly decreases H₂ availability for methanogens and reduces the CH₄ production compared to hay and fresh forage (Tavendale *et al.*, 2005). In contrast, in sulla both preserved forages presented a reduction of the propionic acid proportion and an increase in the C₂:C₃ ratio with respect to fresh sulla, as a result of different ruminal metabolism not associated with a reduction of CH₄ production (Getachew *et al.*, 1998; Tavendale *et al.*, 2005). These different effects depending on the type of forage might be due to the fibre content rather than the CT fractions because the slow fermentation of structural carbohydrates in hay yields low propionic acid (Getachew *et al.*, 1998).

The reduction of the proportions of branched-chain VFA in the presence of CT can be due to an increase in the utilization of branched-chain VFA for microbial protein synthesis (Martínez *et al.*, 2006) and/or to the reduction of protein degradation in the rumen (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat and Benchaar, 2013). Studies on the effect of CT on individual proportions of VFA are not conclusive. The presence of CT in the sainfoin reduced iso-valeric and iso-butyric acid proportions (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012) or had no effect on the proportions of branched-chain VFA (Scharenberg *et al.*, 2007b). This discrepancy and the lack of association between the proportion of branched-

chain VFA and the content of CT might be closely related to the type and degree of polymerization of CT, as reported by Hatew *et al.* (2016).

The $\text{CH}_4/\text{VFA}_{\text{total}}$ ratio was used to compare methanogenesis and VFA production as reported by Hassanat and Benchaar (2013). The reduced ratio together with the high IVOMD and the low CH_4 production in silages with respect to fresh forages might indicate a more efficient microbial fermentation (Guglielmelli *et al.*, 2011). The reduction of the $\text{CH}_4/\text{VFA}_{\text{total}}$ ratio in both preservation processes compared with the fresh forage in sulla, which might be associated with the high FBCT content because methane is mainly generated from structural carbohydrates, but the degradation by the ruminal microbes can be reduced when the fibre fraction is linked to CT.

5. CONCLUSIONS.

The polyphenols, TCT content and CT-fractions were more affected in the silage than in the hay compared to the fresh forage in both legumes. The intensity of the effect of preservation on the parameters of *in vitro* fermentation depends on the type of preservation and the legume species. The silage produced less gas and methane than the fresh forage in both legumes, whereas the hay only produced less gas and methane than the fresh forage in sulla. Sainfoin silage presented a shift towards propionate proportion, reducing the $\text{C}_2:\text{C}_3$ ratio in comparison with hay and fresh forage. Ensiling might be the best preservation method in both forages considering the gas and methane production, $\text{CH}_4/\text{AGV}_{\text{total}}$ ratio and IVOMD.

Capítulo 4

Effects of feeding system during lactation on the content of carotenoids and liposoluble vitamins in plasma and tissues of light lambs. Use of these compounds for traceability of feeding system

Pablo José Rufino-Moya, Margalida Joy, Sandra Lobón, Juan Ramón Bertolín and Mireia Blanco

ABSTRACT.

The objectives of this study were to determine: i) the effect of the maternal feeding (total mixed ration, alfalfa, and sainfoin) on the contents of carotenoids and liposoluble vitamins in the plasma (at start lactation, at weaning and at slaughter) and in the tissues (liver, muscle and fat deposits) of the light lamb; ii) the use of the content of carotenoids and liposoluble vitamins in plasma and tissues of lambs to trace the maternal feeding. During lactation period, 31 pairs of ewe-suckling lamb were randomly assigned to one of the three feeding strategies during lactation. A group was housed indoors (intensive), a second group rotationally grazed in alfalfa and the third group rotationally grazed in sainfoin. At weaning (42 ± 1 days of age), lambs received a high-concentrate diet until they reached 23 ± 1 kg. At weaning, the concentrations of lutein, α and γ -tocopherol in plasma mimicked the contents in the feedstuffs ($P < 0.001$) but most of the differences disappeared at slaughter. In liver, the maternal feeding only affected the retinol content, showing sainfoin lambs higher content than alfalfa and intensive lambs ($P < 0.01$). In muscle, only α -tocopherol was affected by feeding system, presenting sainfoin lambs the highest content, alfalfa lambs intermediate and intensive lambs the lowest content ($P < 0.001$). Alfalfa and sainfoin lambs had higher retinol content than intensive lambs in both fat deposits ($P < 0.001$), and the sainfoin lambs presented greater content than alfalfa lambs in subcutaneous fat ($P < 0.001$). The contents of α -tocopherol in both deposits were greatest in sainfoin lambs, intermediate in alfalfa lambs and lowest in intensive lambs ($P < 0.001$). When plasma concentration of retinol, lutein and tocopherols at weaning were used in a discriminant model, 90% of the lambs were correctly classified into alfalfa, sainfoin and intensive lambs, whereas the 100% of the animals were classified when grazing (alfalfa and sainfoin) vs. intensive were compared. The carcasses were correctly classified into alfalfa, sainfoin and intensive system in a percentage of 84% using various analytes in different tissues. This percentage decreased when the traceability was studied for each tissue separately, ranging between 58 and 71%. Then, the study of carotenoids and liposoluble vitamins in the tissues has to be combined with other parameters to improve the traceability.

Keywords:

Retinol; lutein; tocopherol; muscle; liver; fat; plasma; biomarker.

1. INTRODUCTION.

Traditional systems of lamb meat production under Mediterranean conditions have partially or totally replaced grazing with indoor feeding (Ripoll-Bosch *et al.*, 2014a), which has an easier flock management and provides a more homogeneous product (Bernués *et al.*, 2011). During lactation, ewes are usually fed *ad libitum* a dry total mixed ration or hay/straw plus concentrate indoors whereas lambs are almost exclusively milk fed until weaning. After weaning (45 days old), lambs are fed high-concentrate diets to obtain carcasses of 8-12 kg before 3-4 months of age. However, the interest for grazing systems has increased because they are more sustainable than intensive systems (Ripoll-Bosch *et al.*, 2014a) and they meet the consumer demands for products that are considered natural, healthy and respectful of animal welfare (Prache *et al.*, 2005; Montossi *et al.*, 2013; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013). In fact, grazing sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) during lactation improved the fatty acid profile and shelf life of the lamb meat even after a finishing period on concentrates when compared to grazing alfalfa (*Medicago sativa*) or intensive-feeding (Lobón *et al.*, 2017a). The effect on meat shelf life could be related to the content of carotenoids and tocopherols and/or the presence of condensed tannins from sainfoin.

Carotenoids and tocopherols are abundant in the fresh forage and their concentrations differ among species, preservation methods and phenological stages (Ballet *et al.*, 2000; Kalač, 2012). These compounds can not be synthesized by mammals, so they have to be provided in the diet. The content of these compounds in the milk depends on the ewe's diet (Gallardo *et al.*, 2015; Valdivielso *et al.*, 2015a) and they are transferred through the milk to the lamb's tissues (Capper *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 2008). The deposition of these compounds in the lamb's tissues depends on several factors such as the tissue (Bertolín *et al.*, 2018), the diet or source of tocopherol/carotenoids (Ochoa *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 2014), level of supplementation (Kasapidou *et al.*, 2009) and the interaction between carotenoids and tocopherols (Asadian and Mézes, 1996; Yang *et al.*, 2002). Carotenoids and liposoluble vitamins have been used to authenticate production system in lambs (Dian *et al.*, 2007a; Álvarez *et al.*, 2014).

The objective of this study were evaluate: i) the influence of the maternal feeding on carotenoids and liposoluble vitamins content in lamb's plasma and tissues after a

finishing period fed-concentrate; ii) use of carotenoids and liposoluble vitamins to authenticate the maternal feeding system.

2. MATERIAL AND METHODS.

The experiment was conducted at the facilities of the CITA Research Centre in Zaragoza (41° 42' N, 0° 47' W, 216 m a.s.l.), located in the Ebro Valley, north-eastern Spain. The experiment and slaughter procedures were conducted in accordance with the requirements of the Spanish Policy for Animal Protection RD 53/2013 (BOE, n° 34, 8-2-2013), which meets the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

2.1. Animal management and experimental design.

This experiment is part of a broad study described in detail in Lobón *et al.* (2019b).

After lambing, 31 single-bearing ewes and their male lambs were randomly assigned to one of the three feeding strategies (intensive, alfalfa and sainfoin) during the lactation period. Treatments were balanced according to the lambing date, ewe body weight (BW), and lamb BW at the start of the experiment.

- Intensive: 11 suckling lambs were permanently housed indoors with continuous access to their dams from birth to weaning. The dams received a dry total mixed ration (TMR) composed by barley straw (500 g kg⁻¹), corn grain (116 g kg⁻¹), barley grain (115 g kg⁻¹), alfalfa pellet (93 g kg⁻¹), rapeseed meal (70 g kg⁻¹), and soybean meal (33 g kg⁻¹) and sugar beet molasses (35 g kg⁻¹), cottonseed (14 g kg⁻¹), calcium carbonate (19 g kg⁻¹), mineral–vitamin corrector (3 g kg⁻¹) and salt (2 g kg⁻¹). The lambs had access through a creep concentrate feeder to a commercial pelleted concentrate composed by corn (350 g kg⁻¹), soya bean meal (238 g kg⁻¹), wheat (200 g kg⁻¹), barley (150 g kg⁻¹), bran (27 g kg⁻¹), calcium carbonate (15 g kg⁻¹), palm oil (12 g kg⁻¹) and minerals and salt (8 g kg⁻¹).

- Alfalfa: 10 suckling lambs rotationally grazed with their dams on alfalfa from birth to weaning. The lambs had access to the commercial concentrate. Grazing animals moved to a new paddock at 7-10 days.

- Sainfoin: 10 suckling lambs rotationally grazed with their dams on sainfoin from birth to weaning. The lambs had access to the commercial concentrate described above. Grazing animals moved to a new paddock every 7-10 days.

After weaning (42 ± 2 d), the lambs from each maternal feeding were allocated in 2 pens and received the commercial concentrate and straw *ad libitum*. Water and mineral blocks were always offered *ad libitum*.

2.2. Measurements and sampling procedures.

Samples of alfalfa and sainfoin were collected weekly by clipping with an electrical mower (3 cm above ground level) in five 0.25 m² quadrats randomly located in the paddock. Samples of the TMR and the concentrate were obtained weekly. Part of these samples were oven-dried at 60 °C to a constant weight to obtain the dry matter content and other part of the samples were freeze-dried. The freeze-dried samples were ground to pass a 0.2 mm screen (Rotary Mill, ZM200 Retsch, Haan, Germany) and stored at -80 °C until further analyses to determine carotenoids and tocopherols.

Lambs were bled from the jugular vein in vacuum tubes with heparin (Vacuette, Kremsmünster, Austria) at 1 week of age, at weaning and at slaughter. Samples were centrifuged at 3000×g at 4 °C for 15 min and plasma collected and stored at -80 °C. When the lambs reached the target slaughter weight (22-24 kg), they were slaughtered in the experimental abattoir of the Research Centre. After slaughter, carcasses were chilled at 4 °C for 24 h in total darkness. Then, the *longissimus dorsi* muscle from the first to sixth lumbar vertebrae and the liver were excised and sampled. Muscle and liver samples were lyophilized, vacuum-packed and stored at -80 °C. Samples of the perirenal and caudal subcutaneous fat were obtained and immediately vacuum-packed and frozen at -80 °C until analyses.

2.3. Carotenoids, retinol and tocopherol analyses.

Carotenoids and tocopherols were extracted 3 times from the feedstuffs (50 mg-samples of the forages and 200 mg-samples of the concentrates) with 3 mL of methanol:acetone:petroleum ether (1:1:1, v:v:v, 0.01% (w/v) of BHT) solution, until a white pellet was obtained following the indications of Fu *et al.* (2011). After this, the supernatant (1 mL for the forages and all the supernatant for the concentrates) was evaporated.

Lutein, retinol and tocopherols in plasma were extracted following the procedures described by Lyan *et al.* (2001) with some modifications. Briefly, 1 mL of plasma was deproteinised by 1 mL of ethanol and the lipophilic compounds were extracted twice with

5 mL of n-hexane:ethyl acetate (9:1, v:v, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of BHT) solution. Then, the supernatant was evaporated.

Carotenoids, tocopherols and retinol in lamb's tissues were extracted following the procedures of Bertolín *et al.* (2018). Samples were saponified overnight with ascorbic acid and 10% KOH in ethanol:distilled water (50:50, v:v) under nitrogen atmosphere and liquid-liquid extraction with a n-hexane:ethyl acetate (9:1, v:v, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of BHT) solution. Then, the supernatant was evaporated.

The dry residues obtained in the extractions of all the matrices were dissolved in 1 mL of acetonitrile:dichloromethane:methanol (75:10:15, v:v:v), filtration through a 0.22 μm PTFE filter and transfer into a 2-mL glass screw-top vial for automatic sampling using 5 μL for UPLC.

The chromatographic procedures for forages and feedstuffs were those used by Chauveau-Duriot *et al.* (2010), whereas for plasma and animal tissues those used by Bertolín *et al.* (2018). For all the determinations, an ACQUITY UPLC H-Class liquid chromatograph (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a silica-based bonded phase column (Acquity UPLC HSS T3, 1.8 μm x 2.1 mm i.d. x 150 mm column, Waters), an absorbance detector (Acquity UPLC Photodiode Array PDA e λ Detector; Waters) and a fluorescence detector (2475 Multi λ Fluorescence Detector, Waters) controlled by the Empower 3 software was used.

Carotenoids and retinol were detected by absorbance at 450 nm and 325 nm respectively and tocopherols by fluorescence emission at $\lambda_{\text{excitation}} = 295$ and $\lambda_{\text{emission}} = 330$ nm. β -carotene, lutein, retinol and tocopherols were identified by comparison of their retention times and spectral analyses and were quantified by external calibration with those pure standards whose concentrations were previously determined using molar absorption coefficients previously reported by Bertolín *et al.* (2018). Zeaxanthin, neoxanthin, violaxanthin, 13Z- β -carotene and 9Z- β -carotene were identified by comparison of their retention times and spectral analyses previously reported (Rodriguez-Amaya, 2001; Chauveau-Duriot *et al.*, 2010), and quantified (semiquantitative analysis) by calculating response factors to β -carotene calibration based on their molar absorption coefficients (Rodriguez-Amaya, 2001). β -carotene (97% purity), lutein (97% purity), retinol (97.5% purity) and tocopherols (99% purity α -tocopherol, 97% purity γ -tocopherol) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4. Calculations and statistical analyses.

Data were analyzed using the SAS v.9.3 statistical software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The mean content of carotenoids and tocopherols of the feedstuffs was obtained using the procedure Proc means. The normality of the residues of all the variables was tested with the Shapiro-Wilk test. Normality of the residues of the concentrations of retinol, α - and γ -tocopherol in plasma and γ -tocopherol in the liver could not be verified. Then, means were compared with the Kruskal–Wallis non-parametric test of the NPAR1WAY procedure.

Normality of the residues of lutein in plasma and muscle, retinol in the liver and α -tocopherol in the perirenal fat was achieved with transformed data. All the metabolites detected in subcutaneous fat, and the contents of retinol and γ -tocopherol in the liver had normal distribution of their residues. The concentration of the liposoluble vitamins in the lamb's tissues that had normal distribution of their residues were tested by Analysis of Variance (ANOVA) using the GLM procedure with the maternal feeding as fixed effect. Least square means were estimated and differences were tested. For all tests, the level of significance was set at 0.05. Trends were discussed when *P*-values were < 0.10.

Finally, stepwise selection procedures were used to reduce the number of explanatory variables and further a canonical discrimination procedure was used to ascertain the key point variables that would contribute to a discrimination function of lambs based on carotenoid and liposoluble vitamins contents when the whole carcass was considered. In addition, canonical discrimination procedures were used for each tissue and sampling of plasma separately. A set of analyses was performed considering the three maternal feedings and another set considering intensive *vs.* grazing (alfalfa and sainfoin) lambs. Canonical correlations with a *P*-value lower than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS.

3.1. Carotenoids and tocopherol in the feedstuffs.

The contents of carotenoids and tocopherols of the feedstuffs offered to the dams and of the concentrate of the lamb are shown in Table 1. The main carotenes and xanthophylls were detected in both fresh forages but not in the TMR and the concentrate. Alfalfa and sainfoin had greater carotenoid contents than the TMR and concentrate of the lamb. The most abundant carotenoid found both fresh forages was lutein (50% of total

carotenoids in alfalfa and 47% in sainfoin), followed by violaxantin in alfalfa (16%) and all- β -carotene in sainfoin (24%). Both tocopherols were detected in forages, TMR and concentrate. Legume forages presented greater content of α -tocopherol than the TMR and concentrate, representing this isoform the 92% and the 94% of total tocopherols in alfalfa and sainfoin, respectively. However, the TMR and concentrate had higher γ -tocopherol content than fresh forages. The TMR presented the greatest content, representing the 86% of total tocopherols,

Table 1. Contents (mean \pm standard error) of carotenoids and tocopherols in the feedstuffs.

Item	Ewe's feedstuffs			Lamb's
	TMR ¹	Alfalfa	Sainfoin	Concentrate
Neoxantin, $\mu\text{g/g DM}$	ND	33 \pm 4.2	28 \pm 2.7	ND
Violaxantin, $\mu\text{g/g DM}$	ND	35 \pm 5.0	30 \pm 3.9	ND
Zeaxantin, $\mu\text{g/g DM}$	ND	3.7 \pm 0.4	6.1 \pm 0.6	0.2 \pm 0.04
Lutein, $\mu\text{g/g DM}$	0.1 \pm 0.02	111 \pm 13.8	127 \pm 11.0	0.3 \pm 0.04
13-Z- β -carotene, $\mu\text{g/g DM}$	0.2 \pm 0.03	3.4 \pm 0.55	4.1 \pm 0.41	ND
9-Z- β -carotene, $\mu\text{g/g DM}$	ND	5.3 \pm 0.74	7.2 \pm 0.66	ND
All- β -carotene, $\mu\text{g/g DM}$	ND	31 \pm 3.9	65 \pm 6.5	ND
α -tocopherol, $\mu\text{g/g DM}$	5.4 \pm 0.35	35 \pm 4.8	89 \pm 7.3	0.4 \pm 0.10
γ -tocopherol, $\mu\text{g/g DM}$	34 \pm 2.2	2.9 \pm 0.39	5.8 \pm 0.47	6.7 \pm 0.78

¹ Total mixed ration given to the ewes indoors in the intensive system; ND: not detected

3.2. Plasma lutein, retinol and tocopherols concentrations.

Lutein was only detected at weaning in small quantities (above the detection limit), presenting sainfoin and alfalfa lambs greater concentration in plasma than the intensive lambs (31, 26 and 0 ng/mL, respectively; s.e. = 11, $P < 0.001$). The concentration of retinol, α -tocopherol and γ -tocopherol in plasma is presented in Figure 1. The effect of the maternal feeding on the concentration of retinol was mild as only tendencies between feedings were evident, alfalfa lambs tended to present greater concentration than the intensive lambs at the start of lactation ($P < 0.10$) and at weaning and the intensive lambs tended to present greater concentration than sainfoin lambs at slaughter ($P < 0.10$). The maternal feeding affected α -tocopherol concentration in the first week of lactation ($P < 0.01$) and at weaning ($P < 0.001$) but differences disappeared at slaughter ($P > 0.05$). In the first week of lactation, alfalfa and sainfoin lambs higher content than the intensive lambs ($P < 0.01$). At weaning, sainfoin lambs had the greatest

concentration of α -tocopherol, alfalfa lambs intermediate and intensive lambs the lowest concentration ($P < 0.001$).

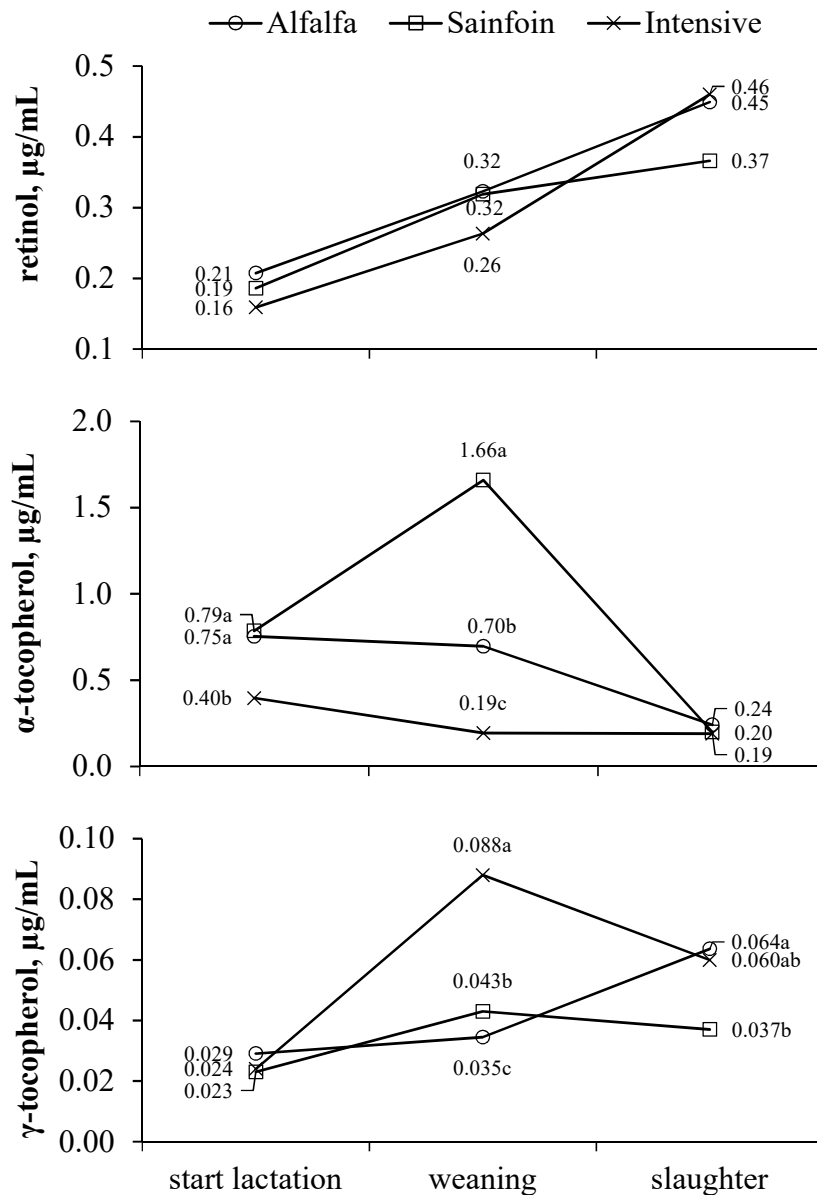


Figure 1. Effect of the maternal feeding on plasma retinol, α - and γ -tocopherol concentrations in the lamb. Within a stage, means with different letter differ at $P < 0.05$.

The concentration of γ -tocopherol at weaning and slaughter also was affected by the maternal feeding ($P < 0.05$). At weaning, the intensive lambs had the greatest γ -tocopherol concentration, sainfoin lambs intermediate concentrations and alfalfa lambs the lowest concentrations ($P < 0.001$). At slaughter, Alfalfa lambs had greater γ -tocopherol concentration than sainfoin lambs ($P < 0.05$), whereas TMR lambs tended to present greater concentration than sainfoin lambs ($P < 0.10$).

3.3. Lutein, retinol and tocopherols in the tissues of the lambs.

The effect of the maternal feeding on the contents of lutein, retinol and tocopherols in the tissues of the lamb after a finishing period of concentrate-fed is shown in Table 2. In the liver, the maternal feeding had only effect on retinol content ($P < 0.01$), showing the sainfoin lambs two-fold and three-fold greater retinol content than alfalfa and intensive lambs, respectively ($P < 0.01$). In the muscle, the maternal feeding affected α -tocopherol content ($P < 0.001$), sainfoin lambs had the greatest content, alfalfa lambs intermediate and the intensive lambs the lowest content ($P < 0.001$). Regarding γ -tocopherol content, the intensive lambs had slightly greater content than both groups of grazing lambs ($P < 0.10$). Regarding the fat depots, maternal feeding affected the retinol and α -tocopherol contents in both fats ($P < 0.001$), presenting the intensive lambs lower contents than sainfoin and alfalfa lambs. Moreover, sainfoin lambs had higher contents than alfalfa lambs in both fat tissues ($P < 0.05$), except for retinol content in the perirenal fat ($P > 0.05$).

Table 2. Effect of the maternal feeding during lactation on the deposition of lutein, retinol and tocopherols in the tissues of the light lamb.

	Intensive ¹	Alfalfa	Sainfoin	s.e.m.	<i>P</i> -value
Liver					
Lutein, ng/g FM ²	3.0	6.0	6.7	.	0.22
Retinol, $\mu\text{g/g}$ FM	2.9 ^b	4.3 ^b	10.9 ^a	0.89	0.003
α -tocopherol $\mu\text{g/g}$ FM	0.41	0.40	0.42	.	0.72
γ -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.20	0.18	0.16	0.02	0.48
Muscle					
Retinol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.031	0.034	0.032	0.001	0.60
α -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.56 ^c	0.97 ^b	1.49 ^a	0.06	< 0.001
γ -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.20	0.17	0.16	0.01	0.053
Perirenal fat					
Retinol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.53 ^b	1.25 ^a	1.59 ^a	0.09	< 0.001
α -tocopherol $\mu\text{g/g}$ FM	1.72 ^c	2.55 ^b	4.75 ^a	.	< 0.001
γ -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	1.48	1.33	1.42	0.07	0.72
Subcutaneous fat					
Retinol, $\mu\text{g/g}$ FM	0.43 ^c	0.85 ^b	1.11 ^a	0.04	< 0.001
α -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	1.5 ^c	2.9 ^b	5.0 ^a	0.28	< 0.001
γ -tocopherol, $\mu\text{g/g}$ FM	1.13	1.05	1.07	0.05	0.82

¹ lambs whose ewes were fed a total mixed ration during lactation; ² fresh matter

Within an analyte, means with different letter differ at $P < 0.05$.

3.4. Relationship between the concentration of the analytes in plasma and the content in the tissues of lambs.

Regarding the correlations between the concentrations of analytes in plasma and the contents in the tissues, at weaning it was observed a modestly correlation in lutein between plasma and the liver ($r = 0.41$; $P < 0.05$), and in retinol between plasma and the perirenal and subcutaneous fat ($r = 0.45-0.46$; $P < 0.01$). There was a moderately strong correlation between the concentration of α -tocopherol in plasma with the contents in the muscle ($r = 0.71$; $P < 0.001$), the perirenal fat ($r = 0.79$; $P < 0.001$) and the subcutaneous fat ($r = 0.74$; $P < 0.001$). The concentration of γ -tocopherol in plasma at weaning was moderately correlated with the content of the analyte in the muscle ($r = 0.51$; $P < 0.01$). At slaughtering, the concentration of retinol in plasma was moderately correlated with the content in muscle ($r = 0.60$; $P < 0.001$) and the concentration of γ -tocopherol in plasma was correlated with the liver ($r = 0.44$; $P < 0.01$).

3.5. Discriminant analysis based on carotenoids and tocopherols.

The percentages of correctly classified samples for each sampling of plasma, carcass and tissues of the lamb into their maternal feeding are reported in Table 4. The analytes in plasma at weaning correctly classified 90% of the samples into their maternal feeding, classifying correctly all the samples of the intensive lambs and misclassified only 3 samples of the other maternal feedings. However, the analytes in plasma at slaughter only classified correctly 53% of the samples into the maternal feeding, especially because most of the samples of alfalfa lambs were misclassified. When the samples of plasma were classified into grazing (alfalfa and sainfoin) and intensive lambs, 100% of samples were classified correctly at weaning and 73% at slaughter.

The canonical discriminant analysis of the analytes in plasma at weaning and slaughter are plotted in Figure 2. At weaning, function 1 (Can 1) in the plot accounted for 83% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of lutein ($r = 0.83$) and α -tocopherol ($r = 0.94$). Function 2 (Can 2) only accounted for 17% of the total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = 0.32$) and γ -tocopherol ($r = 0.61$). At slaughter, Can 1 accounted for 91% of the total of variation and was mainly explained by retinol ($r = 0.54$) and γ -tocopherol ($r = 0.66$). Function 2 only considered for 9% of total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = 0.95$) and γ -tocopherol ($r = 0.73$).

Table 3. Percentages of correctly classified samples into the maternal feeding.

Item	Intensive	Alfalfa	Sainfoin
Plasma at weaning	100%	91%	80%
Plasma at slaughter	60%	18%	80%
Carcass	100%	73%	80%
Liver	50%	55%	70%
Muscle	80%	55%	60%
Perirenal fat	90%	64%	60%
Subcutaneous fat	90%	64%	50%

The canonical discriminant analysis of the analytes in plasma at weaning and slaughter are plotted in Figure 2. At weaning, function 1 (Can 1) in the plot accounted for 83% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of lutein ($r = 0.83$) and α -tocopherol ($r = 0.94$). Function 2 (Can 2) only accounted for 17% of the total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = 0.32$) and γ -tocopherol ($r = 0.61$). At slaughter, Can 1 accounted for 91% of the total of variation and was mainly explained by retinol ($r = 0.54$) and γ -tocopherol ($r = 0.66$). Function 2 only considered for 9% of total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = 0.95$) and γ -tocopherol ($r = 0.73$).

Regarding the classification of the whole carcass into the maternal feeding, the step-wise analysis selected the contents of α -tocopherol in liver, perirenal fat and muscle and retinol in the liver and in the perirenal fat. These analytes allowed the correct classification of 84% of carcasses into their maternal feeding, being all the carcasses of the intensive lambs correctly classified (Table 4). When the carcasses were classified into grazing vs. intensive, 95% of the carcasses were correctly classified, only 2 carcasses of the grazing lambs were misclassified. Regarding the canonical discriminant analysis (Figure 3), Function 1 (Can 1) accounted for 83% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of retinol in the perirenal fat ($r = 0.76$), and the contents of α -tocopherol in the muscle ($r = 0.84$) and perirenal fat ($r = 0.76$). Function 2 only accounted for 17% of the total variability and was mainly determined by the content of retinol in the liver ($r = -0.32$).

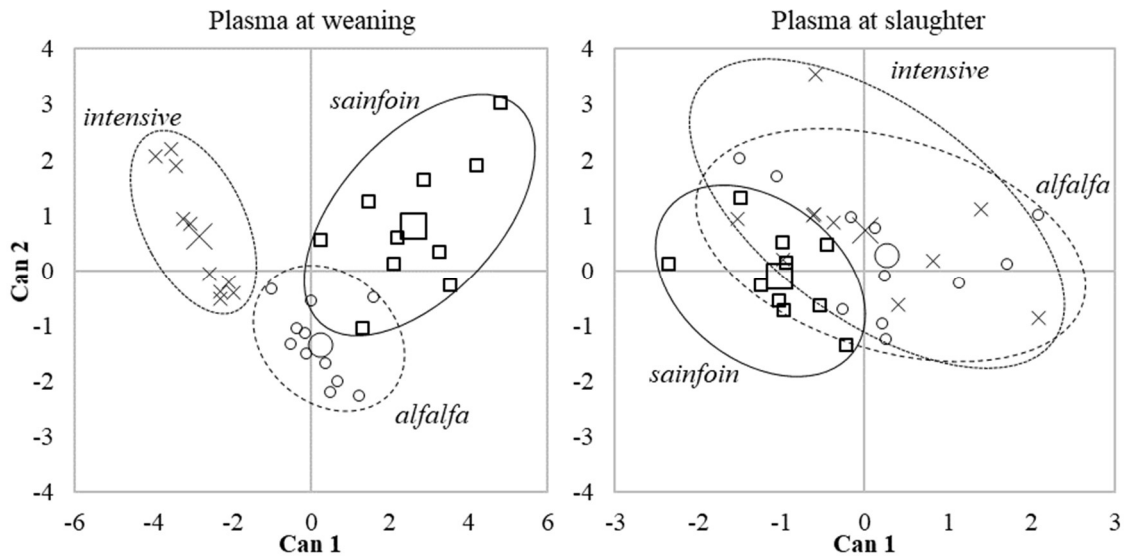


Figure 2. Canonical discriminant plots among maternal feedings in plasma at weaning and at slaughter.

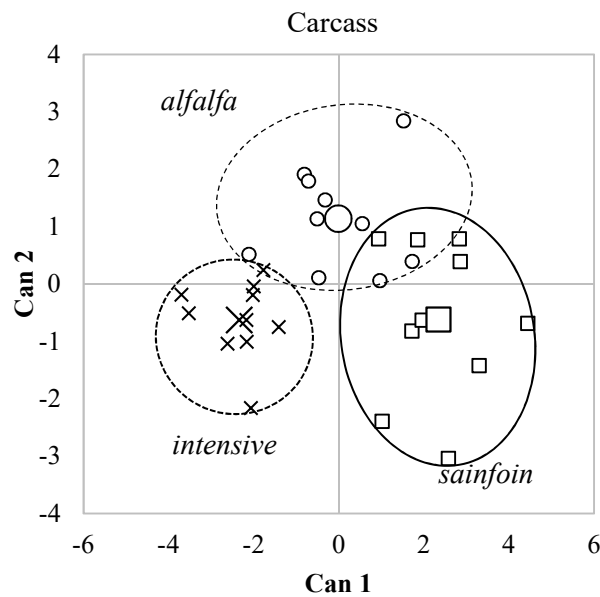


Figure 3. Canonical discriminant plots between maternal feeding in the carcasses of the light lambs using the analytes selected by the step-wise procedure.

The use of the analytes in the tissues correctly classified into their maternal feeding 58%, 65%, 71% and 68% of the samples of liver, muscle, perirenal and subcutaneous fat, respectively (Table 4). When the samples of alfalfa and sainfoin lambs were grouped into grazing lambs, the percentage of correctly classified samples of the liver, muscle, perirenal and subcutaneous fat increased to 73%, 88%, 90% and 90%. The canonical discriminant analysis of the liver, muscle and both fat deposits are plotted in

Figure 4. In the liver, Can 1 accounted for 98% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of retinol ($r = 0.73$) and lutein ($r = 0.40$). Function 2 only accounted for 2% of the total variability. In the muscle, Can 1 accounted for 96% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of α -tocopherol ($r = 0.93$) and γ -tocopherol ($r = -0.50$). Function 2 only accounted for 4% of the total variability.

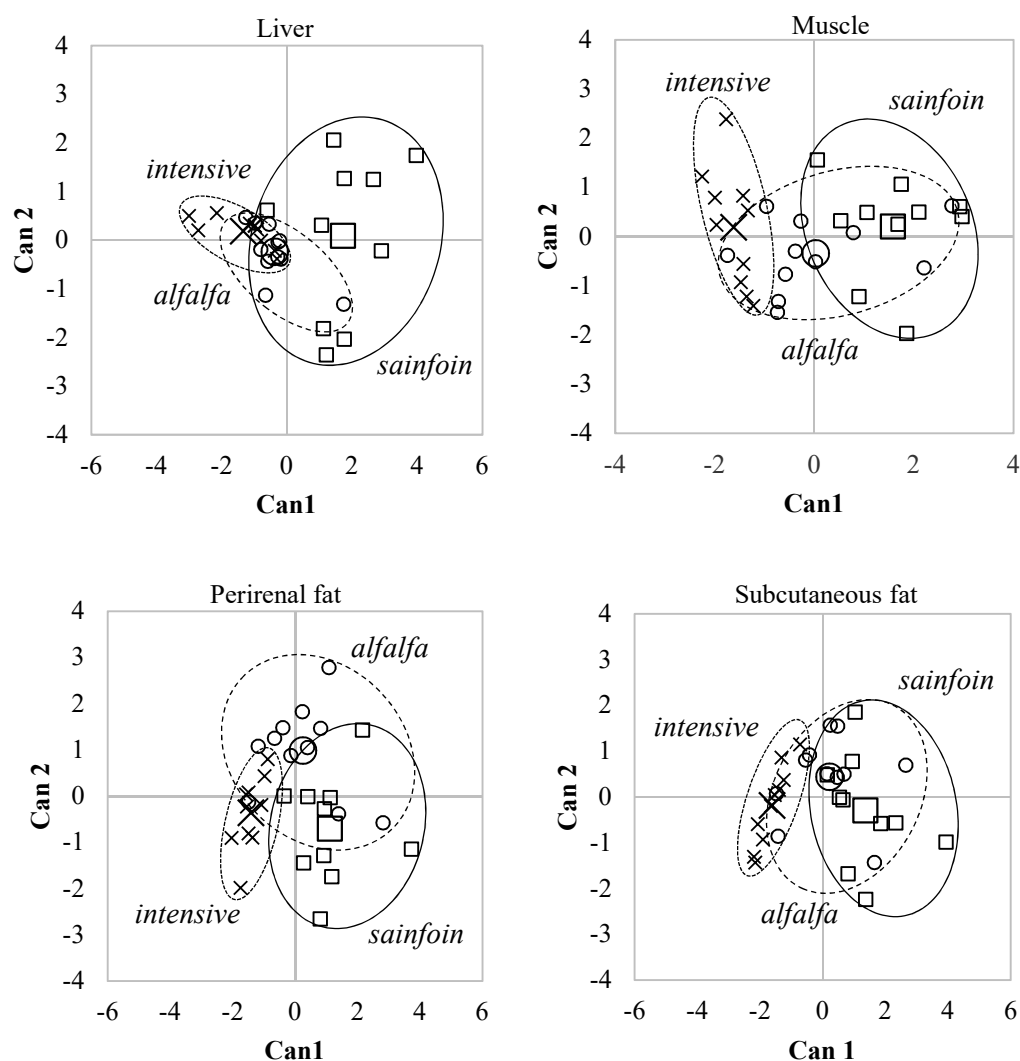


Figure 4. Canonical discriminant plots between maternal feeding in liver, muscle, perirenal and subcutaneous fat using the analytes determined in each tissue.

Regarding the perirenal fat, Can 1 accounted for 66% of the total variation among maternal feedings and was mainly determined by the contents of retinol ($r = 0.94$) and α -tocopherol ($r = 0.87$). Function 2 accounted for 34% of the total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = -0.43$) and γ -tocopherol ($r = -0.22$). In the

subcutaneous fat, Can 1 accounted for 93% of the total variation among maternal feedings and was mainly explained by the contents of retinol ($r = 0.98$) and α -tocopherol ($r = 0.85$). Funtion 2 only accounted for 7% of the total variability and was mainly determined by the content of α - ($r = -0.52$) and γ -tocopherol ($r = -0.23$).

4. DISCUSSION.

4.1. Carotenoids and tocopherols in the feedstuffs.

The detection of the main carotenes and xanthophylls in fresh alfalfa and sainfoin but not in the TMR and the concentrate agrees with previous studies (Prache *et al.*, 2003a; Dian *et al.*, 2007a; Álvarez *et al.*, 2014). The ingredients of the TMR, especially the straw and cereal grains, contain low concentrations of carotenoids (Nozière *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007). The manufacture of the concentrate involves the exposure to high temperatures, the grinding, the mixing with minerals, which may lead to the oxidation of carotenoids (Nozière *et al.*, 2006). Lutein was the most abundant carotenoid present in both fresh forages as it has been previously reported in alfalfa (Livingston *et al.*, 1968; De Oliveira *et al.*, 2012). The detection of α - and γ -tocopherol in fresh forages, presenting the former higher concentration than the latter agrees with Larsen *et al.* (2012), who studied tocopherols in a mixture of alfalfa and perennial ryegrass. To the best of our knowledge, it is the first time to study the content of carotenoids and tocopherols in sainfoin. The fresh forages, as in the case of carotenoids, presented greater α -tocopherol content than the TMR and concentrate as it has been reported in diets fed to ewes and lambs (Álvarez *et al.*, 2014). In the current experiment, the greatest γ -tocopherol content of the TMR and concentrate when compared to the fresh forages is because γ -tocopherol is present in most of the ingredients of the concentrate, as corn (Kurilich and Juvik, 1999), soya bean, rapeseed and cotton seed (Mène-Saffrané and Pellaud, 2017). The greater content of the TMR compared with the concentrates was probably due both to differences in the content of γ -tocopherol of the ingredients and to losses during the pelleting procedure (heat, grinding, mixing with minerals...) which have been reported for vitamin E by McDowell *et al.* (1996).

4.2. Carotenoids and retinol in the plasma and tissues of the lambs.

The detection of lutein and retinol and the absence of β -carotene in the lamb's plasma agrees with the results reported in ovine (Yang *et al.*, 1992; Cardinault *et al.*,

2006). The non-detection of β -carotene in the plasma was ascribed to the high activity of the enzyme β -carotene 15,15'-monooxygenase that converts β -carotene into retinol in sheep (Yang and Tume, 1993). However, in some studies, β -carotene has also been detected in the plasma of lambs fed on pasture until the moment of slaughter (Prache *et al.*, 2003a; Álvarez *et al.*, 2014). Therefore it would be advisable to explore the possibility that a mutation of genes related to the transport of carotenoids could be present in sheep as the non-sense mutation in beta-carotene oxygenase 2 (BCO2) gene, that affects the deposition of carotenoids in ovine fat (Våge and Boman, 2010). In the current experiment, the concentration of lutein in plasma at weaning mimicked the content of lutein in the feedstuffs (sainfoin > alfalfa > TMR) as it has been previously reported in lambs (Prache *et al.*, 2003a; Dian *et al.*, 2007a). Lutein was not detected at slaughter after a finishing period indoors concentrate-fed of around 28 d, which agrees with the short persistence of carotenoids in plasma, around 14 d (Prache *et al.*, 2003b). This reason could explain the absence of difference in lutein content in the liver of the light lambs after the finishing period observed in the current experiment. In the current study, retinol concentration of alfalfa and intensive lambs reflected differences in the content of β -carotenes in the feedstuffs as reported Álvarez *et al.* (2014), that showed that light lambs finished on pasture until slaughter had lower retinol and greater β -carotene in plasma than their counterparts fed concentrates. However, retinol concentration of sainfoin lambs did not reflect the content of β -carotenes of the sainfoin as greater retinol concentration could have been expected at weaning and slaughter. The reason for this remains unclear. A possible explanation could be that the competition among retinol, lutein and tocopherols for lipoproteins that transport them in plasma limited the amount of retinol that could be transported in plasma of sainfoin lambs as occurs with cattle with high intake of carotenoids and tocopherols (Yang *et al.*, 2002). Another explanation could be that there was a high uptake of retinol in the liver which decreased the circulating concentration in plasma at weaning and during the fattening period the concentration did not change because the mobilisation of retinol from the liver to plasma is a highly regulated process (Debier and Larondelle, 2005).

In ruminants, carotenoids and retinol are mainly stored in the liver (Nozière *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015) as it was observed in adult sheep fed fresh forage (Yang *et al.*, 1992; Darwish *et al.*, 2016). In the current experiment, retinol and lutein were detected in the liver of light lambs as reported in suckling lambs grazing with their dams in mountain

pastures (Bertolín *et al.*, 2018). Supporting the previous hypothesis, the greater content of retinol in the liver of sainfoin lambs when compared to alfalfa and intensive lambs could be related to a time- and dose-dependent depletion of retinol caused by the concentrate-fed in the fattening period before slaughter, as reported in steers (Jin *et al.*, 2015). Possibly, the sainfoin lambs would have needed a longer period on concentrate-fed to have the retinol concentration depleted to similar concentrations as that of their counterparts. Another possibility that needs further research could be that the dilution was retarded or reduced due to the possible protection effect by the presence of the metabolites of condensed tannins from sainfoin. In humans, condensed tannins reduced the degradation of β -carotene in the plasma (Lotito and Fraga, 2000) and protected low-density lipoproteins responsible for the transport of these compounds from oxidation (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). Furthermore, the addition of catechin, a monomer of CT, in turkey muscle tissue protects of the gastric degradation to the β -carotene (Gorelik *et al.*, 2005). However, there are no studies on the effect of sainfoin condensed tannins on carotenoid contents, and the effect of condensed tannins on animal performance and product quality are dependent on the type and dose of condensed tannins (Min *et al.*, 2003; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005b). Phenolics compounds of quebracho (López-Andrés *et al.*, 2013) and *Lolium perenne* (López-Andrés *et al.*, 2014) were not found in the lamb liver, but they induced antioxidant effects. The protection effect might be mediated by an indirect effect with the reduction of lipid peroxidation, which would result in an overall improvement of the animal's antioxidant status; and an direct antioxidant activity of the condensed tannins in the gastrointestinal tract, such as a removal or chelation of pro-oxidant compounds (Halliwell *et al.*, 2005; Kerem *et al.*, 2006). In this sense, metabolites of condensed tannins of sainfoin are detected in the rumen, abomasum and small intestine of lambs (Quijada *et al.*, 2018) and therefore, further research is need to elicit if they can be deposited in the tissues of the lambs.

In muscle, retinol but not lutein were detected in the light lambs, which were both detected in suckling lambs (Osorio *et al.*, 2008; Bertolín *et al.*, 2018). The effect of the maternal feeding on retinol content in the muscle was diluted by the concentrate-fed during the fattening period because the effect of the maternal feeding on the muscle content was evident in suckling lambs (Osorio *et al.*, 2008). Supporting this, the effect of vitamin supplementation on retinol content in muscle disappeared just after 30 days on a diet with no vitamin A (Jin *et al.*, 2015).

In both subcutaneous and perirenal fat, retinol but not lutein were detected as previously reported in sucking lambs that grazed in mountain pastures with their dams (Bertolín *et al.*, 2018). In previous studies, lutein was found in subcutaneous fat of grazing wethers (Yang *et al.*, 1992) and perirenal fat of fattened lambs (Prache *et al.*, 2003b). Then, it can be hypothesized that the fattening period when the lambs were concentrate-fed was long enough to dilute and prevent the detection of lutein in the fats depots coming from the milk of the forage-fed ewes. A 28 day-period of concentrate feeding after grazing reduced drastically the estimator of carotenoids, the visible-near-infrared reflectance spectrum, in the perirenal fat of lambs but the estimator was still greater than the concentrate-fed lambs (Huang *et al.*, 2015). The increased retinol content in perirenal fat of alfalfa and sainfoin lambs in comparison with intensive lambs is in agreement with results observed in the perirenal fat of lambs fed with fresh pasture vs. concentrate (Prache *et al.*, 2003b; Álvarez *et al.*, 2014). In the subcutaneous fat, retinol reflected the content of carotenes in the maternal feeding, because there were differences among the three feedings. This difference of effect between-fat deposit could be associated to the differences in precocity of fatty tissue development and accumulation of carotenoid pigments (Priolo *et al.*, 2002; Ripoll *et al.*, 2008).

4.3. Tocopherols in the plasma and tissues of the lambs.

The effect of the maternal feeding was quickly reflected on α -tocopherol concentration in plasma on the first week of lactation as intensive lambs had lower concentration than both groups of grazing lambs due to the transfer of α -tocopherol through the milk (Capper *et al.*, 2005). In this sense, plasma α -tocopherol level increased in neonate lambs in response to the supplementation of vitamin E and selenium of the ewes during late gestation (Sterndale *et al.*, 2018) or after 7 days of supplementation in fattening lambs (Judson *et al.*, 1991; Guidera *et al.*, 1997; González-Calvo *et al.*, 2015). A longer period on the maternal diet was needed to reflect the differences in the content of α -tocopherol of the feedstuffs between alfalfa and sainfoin lambs, plasma reflected the differences in α -tocopherol content of the feedstuffs at weaning (sainfoin > alfalfa > intensive). Furthermore, the increase of α -tocopherol content in sainfoin lambs could have been affected by the CT of sainfoin as reported (Shabtay *et al.*, 2008), who found greater α -tocopherol content in plasma of beef fed with pomegranate peel, rich in CT, respect to beef fed with concentrate. From weaning to slaughter, the content of α -tocopherol in plasma decreased in alfalfa and sainfoin lambs attaining similar concentrations as those

of the intensive lambs probably due to a dilution effect in fattening period. In this sense, there was a depletion of plasma α -tocopherol concentration of wethers that were fed vitamin E deficient rations after grazing (Fry *et al.*, 1993). As α -tocopherol, the concentration of γ -tocopherol in plasma at weaning reflected the differences in the contents of the feedstuffs (intensive > sainfoin > alfalfa). During the fattening period, the concentration of γ -tocopherol in the intensive and alfalfa lambs changed in response to the content of this analyte in the concentrate but not in sainfoin lambs. In this sense, γ -tocopherol concentration in plasma responded to γ -tocopherol supplementation in ewes (Kasimanickam *et al.*, 2012). The reason for the absence of response of sainfoin lambs might be related to the presence of condensed tannins, as Larrain *et al.* (2008) proposed studying the inclusion of high-tannin sorghum in diets of finishing beef and observed a reduction of γ -tocopherol content in *longissimus lumborum* of steers. More studies related to the relationship between the presence of tannins and liposoluble vitamins in the plasma remains to be elucidated.

The α - and γ -tocopherol are similarly absorbed but there is a negative discrimination of γ -tocopherol in the liver (Debier and Larondelle (2005), which prevents potential modifications of their concentration in tissues through diet. The detection of α - and γ -tocopherol in the liver recorded is in agreement with the results reported in suckling lambs that grazed with their dams (Bertolín *et al.*, 2018) and in lambs fed with concentrate enriched with rapeseed oil, fish oil or carnolic acid (Rozbicka-Wieczorek *et al.*, 2016). Usually, α -tocopherol content in liver reflects differences due to the diet when lambs received the diets until slaughter (Pearce *et al.*, 2005; Kasapidou *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2017). In the current experiment, the different α -tocopherol content in the maternal feeding was not reflected in the liver probably due to the similar diet received during the finishing period, which could dilute the effect of maternal feeding during the suckling period. In this sense, Judson *et al.* (1991) reported lambs fed a single dose of 0, 15, 30 and 60 mg/kg α -tocopherol had similar α -tocopherol content in the liver just 7 days after the unique dose, whereas the lambs that received 120 mg/kg α -tocopherol had greater content in the liver than the control lambs even after 64 days.

In the current experiment, α - and γ -tocopherol were detected in muscle of lambs as reported previously in suckling lambs (Osorio *et al.*, 2008; Bertolín *et al.*, 2018). The different α -tocopherol content in alfalfa, sainfoin and TMR was reflected in the muscle content of lambs in agreement with previous studies (Kasapidou *et al.*, 2009;

D'Alessandro *et al.*, 2012; Ponnampalam *et al.*, 2012). It is possible that the presence of condensed tannins from sainfoin affected α -tocopherol deposition in the muscle. In fact, in spite of the differences in the metabolites of the muscle of alfalfa and sainfoin lambs, analysed by HPLC-ESI-QTOF MS, none of the modified signals corresponded to metabolites of proanthocyanidins (Rufino-Moya *et al.*, 2017). However, further research on the whole metabolome was suggested. The inclusion of rosemary distillation residues, which contain condensed tannins, in the diet of lambs increased α -tocopherol deposition in the muscle (Yagoubi *et al.*, 2018). However, the content of α -tocopherol was not affected by the presence of condensed tannins of the extract of red wine in muscle of lambs (Muíño *et al.*, 2014) or by the condensed tannins of sorghum in steers (Larraín *et al.*, 2008). Regarding γ -tocopherol content in muscle, the tendency observed in the current experiment is in line with the results reported by Osorio *et al.* (2008), who reported that γ -tocopherol content in muscle reflected the differences in intake. The tendency could be due to a possible dilution effect during fattening period.

The fat constitutes one of the main deposition tissues of tocopherols (Ochoa *et al.*, 1992; Kasapidou *et al.*, 2009). Both α - and γ -tocopherol were detected in perirenal and subcutaneous fat deposits, the main deposit of tocopherols in the body (Debier and Larondelle, 2005). Similarly, previous studies found α - and γ -tocopherol in both fat deposits of suckling lambs (Bertolín *et al.*, 2018) and in the backfat of fattening lambs (Lee *et al.*, 2007b). The contents of α -tocopherol in both fat deposits were associated to the content in the feedstuffs as has been reported in previous studies when the feeding system based in pasture leads to greater α -tocopherol content than concentrate in perirenal fat of light lambs (Álvarez *et al.*, 2014) and in subcutaneous fat of cattle (Yang *et al.*, 2002). The vitamin E supplementation of diet with different forms increased α -tocopherol content in adipose tissue (Asadian and Mézes, 1996; Kasapidou *et al.*, 2009). Alfalfa, sainfoin and intensive lambs presented similar the concentration of γ -tocopherol in both fat deposits, despite of the differences of the γ -tocopherol content in ewes' diets. It is more difficult to modify the concentration of γ -tocopherol than α -tocopherol in the tissues through the diet (Debier and Larondelle, 2005).

4.4. Discrimination analysis based on carotenoids and tocopherols.

In the current experiment, the use of using lutein, retinol and tocopherols in plasma at weaning improves the percentage of correctly classified samples respect to the

use of retinol and α -tocopherol in plasma of light lambs at slaughter reported by Álvarez *et al.* (2014). However, the classification of samples at slaughter obtained in the current experiment was poor and was not able to discriminate correctly the maternal feeding due to the similar feeding in the fattening period.

The accuracy of the classification of the animals into their maternal feeding using carotenoids and tocopherols was better for the carcasses than for the tissues separately. In this sense, Álvarez *et al.* (2014) recommended to use a combination of carotenoids and liposoluble vitamins in different tissues to improve the reliability of the discrimination between feeding systems for lambs. Regarding the classification of carcasses, some studies classified correctly the 100% of carcass into their feeding system using absolute valour of the integral (AVI) of the translated spectra of perirenal fat (Prache *et al.*, 2003b; Ripoll *et al.*, 2008) and using retinol and the α -tocopherol content, AVI and color parameters in perirenal fat (Álvarez *et al.*, 2014). Nevertheless, the discrimination of the lambs of the current experiment using the parameters of subcutaneous and perirenal fat colour showed lower accuracy than using the content of retinol and tocopherols in both fat deposits (Lobón *et al.*, 2019b). The abovementioned studies (Prache *et al.*, 2003a; Ripoll *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2014) had greater accuracy because the lambs were fed differently until slaughter, whereas in the present study lambs had different treatment during the suckling period and thereafter they all were concentrate fed until slaughter. To the best of our knowledge, studies of discrimination using carotenoids and liposoluble vitamins in liver and muscle have not been found in the scientific literature consulted. However, there was a 82-100% accuracy in the discrimination among four maternal feeding groups using the fatty acid profile of meat of suckling lambs (Lobón *et al.*, 2019a), then the search for other biomarkers was suggested.

5. CONCLUSIONS.

The contents of carotenoids and tocopherols from the feedstuffs should have been transferred through the milk to the plasma at weaning of the suckling lambs. Surprisingly, the effect of the maternal feeding still affected the content of retinol in liver and fat deposits and the content of α -tocopherol in muscle and fat deposits after a finishing period. The use of retinol, lutein and tocopherols in plasma at weaning was an *in vivo* excellent tool to trace the maternal feeding because the 100% of the animals were accurately classified into grazing or intensive lambs. However, the use of carotenoids and

tocopherols should be combined with other metabolites to accurately trace the maternal feeding after a finishing period.

V. Consideraciones Finales

En los últimos años se ha incrementado el interés en la reintroducción del pastoreo, especialmente de leguminosas, en el ovino de carne para mejorar la rentabilidad y sostenibilidad de las explotaciones. En anteriores estudios llevados a cabo en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) se encontraron diferencias en los rendimientos productivos y en la calidad de la carne de los corderos cuyas madres se alimentaron en pastoreo de alfalfa, de esparceta o de una dieta constituida por una ración mixta seca en estabulación. El pastoreo de esparceta mejoró la proporción de ácidos grasos poliinsaturados n-3 mientras que redujo la oxidación lipídica en la carne de los corderos, seguido del pastoreo de alfalfa y de la alimentación intensiva (Lobón *et al.*, 2017a). Además, la inclusión de quebracho en la dieta de ovejas tuvo efectos beneficiosos, aunque de pequeña magnitud, sobre la oxidación lipídica (Lobón *et al.*, 2017b) y el perfil de ácidos grasos en la carne del cordero lechal (Lobón *et al.*, 2019a). Parte de estas diferencias podrían ser debidas a la presencia de compuestos secundarios, como los taninos condensados (TC) y los carotenoides y tocoferoles de los forrajes frescos.

Hasta hace unos años, no se han tenido en cuenta los efectos que los compuestos secundarios presentes en los alimentos de los rumiantes podrían tener sobre la fermentación ruminal así como sobre la producción y la calidad de los productos de origen animal.

1. FERMENTACIÓN RUMINAL.

La inclusión de TC en la dieta de rumiantes puede ser una buena herramienta para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal al inhibir la degradación de la proteína y disminuir las emisiones de metano, reduciendo consecuentemente las pérdidas energéticas. Sin embargo, la magnitud de los efectos depende de numerosos factores como son la fuente de TC, el contenido y tipo de TC, la especie, el estado fenológico y la conservación del forraje. La información existente sobre la fermentación ruminal según la suplementación de concentrado con TC procedentes del quebracho en dietas forrajeras de ovejas en lactación es escasa. Del mismo modo, es escasa la información sobre la fermentación ruminal de la alfalfa, esparceta y zulla según el estado fenológico o la conservación de los mismos. Por ello, se realizaron tres ensayos de fermentación *in vitro*: el Ensayo 1, en el cual se estudió el efecto de la inclusión de un concentrado comercial y un concentrado con quebracho en dietas con forrajes de distinta calidad (heno y forraje

fresco), utilizadas comúnmente en ganaderías de ovino; el Ensayo 2, en el cual se determinó el efecto de los TC de esparceta comparando con la alfalfa y usando un bloqueante de los TC (polietilenglicol) en tres estados fenológicos distintos; y el Ensayo 3, en el cual se evaluó el efecto del método de conservación en dos leguminosas con un contenido medio de TC como son la esparceta y la zulla.

1.1. Degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica.

La degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) depende en gran medida de la composición química, reduciéndose cuando aumenta el contenido de fibra de los sustratos (Ammar *et al.*, 1999; Calabrò *et al.*, 2005; Navarro-Villa *et al.*, 2011). Por otro lado, la presencia de TC en la dieta puede provocar una reducción de la DIVMO debido a su capacidad para formar complejos con las moléculas del alimento haciéndolas menos disponibles para su degradación en el rumen (McSweeney *et al.*, 2001b; Mueller-Harvey, 2006).

Según los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados, la composición química tuvo una mayor influencia sobre la DIVMO que los TC. En este sentido, los sustratos con mayor contenido en fibra presentaron una DIVMO más baja, como ya se ha descrito anteriormente (Ammar *et al.*, 1999; Calabrò *et al.*, 2005; Navarro-Villa *et al.*, 2011). Así, las dietas a base forraje fresco, con un menor contenido en FND, presentaron mayor DIVMO que en las dietas a base de heno, tanto en la pradera del Ensayo 1 como en la esparceta y la zulla del Ensayo 3. Además, la esparceta presentó mayor DIVMO que en la alfalfa (Ensayo 2) debido a su menor contenido en fibra y su mayor contenido en carbohidratos no estructurales (Guglielmelli *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013). Los cambios que se producen en la composición química de la alfalfa con el avance del estado fenológico también quedaron patentes con la reducción de la DIVMO. La esparceta presentó la mayor DIVMO al inicio de la floración, como ha sido recogido en estudios anteriores (Theodoridou *et al.*, 2011), independientemente de la adición de PEG. Aunque, la similar composición química y los similares contenidos y fracciones de TC de la esparceta en estado vegetativo y al inicio de floración no permitieron dejar claro el motivo de dicha diferencia.

Los TC presentes en la dieta, así como sus fracciones, pueden influir en la DIVMO. Diversos autores han observado una reducción de la DIVMO cuando se incluye TC de quebracho en concentraciones de 15 g/kg o > 50 g/kg MS (Getachew *et al.*, 2008;

Castro-Montoya *et al.*, 2018). Sin embargo, los resultados de la presente memoria muestran que la inclusión del concentrado con quebracho incrementó la DIVMO en la dieta basada en heno, pero sólo tendió a aumentarla en la de pasto fresco, lo que pudo ser debido en mayor grado al menor contenido en fibra de la dieta que a la presencia de TC. Es interesante destacar que la inclusión de 22,5 g/kg MS de TC de quebracho en dietas basadas en forraje:concentrado al 70:30 incrementó la DIVMO sin que se afectaran a otros parámetros de fermentación. Sería interesante realizar el estudio con un periodo de fermentación más largo, ya que el concentrado es de degradación rápida, mientras que el forraje tiene una degradación más lenta, siendo ello especialmente notable en las dietas basadas en heno. Además, el efecto de los TC sobre la degradabilidad de la dieta puede variar dependiendo del periodo de fermentación según describieron Hervás *et al.* (2003a).

Los TC de esparceta también tuvieron cierto efecto sobre la DIVMO (Ensayo 2), aunque no en todos los estados fenológicos estudiados. La adición de PEG a la esparceta en estado vegetativo incrementó dicho parámetro. Ello podría ser debido que el mayor contenido total de TC y de sus fracciones se producen en el estado vegetativo, por lo tanto, el efecto de la adición de PEG fue más evidente en este estado. Los silos de zulla y esparceta presentaron mayor DIVMO y mayor contenido de TC ligados a fibra que en sus henos homólogos. Sin embargo, únicamente varió la composición química entre el heno y el silo de zulla. Dicho resultado podría estar relacionado con que el proceso de ensilado altera beneficiosamente la estructura de la pared celular facilitando el acceso a los microorganismos ruminales como indicaron Arroquy *et al.* (2014). Aunque, la mayor degradabilidad del silo podría también estar asociada a las fracciones de TC.

1.2. Producción de gas y metano.

Es deseable reducir las pérdidas energéticas que se producen durante la fermentación ruminal debido a la producción de gas y especialmente debido a la producción de metano (Johnson y Johnson, 1995), la cual, a su vez, está en detrimento de la síntesis de proteína microbiana (Mauricio *et al.*, 2001; Guglielmelli *et al.*, 2011). La producción de gas y metano, procedente de la degradación de los sustratos por parte de los microorganismos, depende de la composición química de la dieta. Un mayor contenido en fibra generalmente da lugar a una mayor producción de gas y metano (Calabrò *et al.*, 2005; Beauchemin *et al.*, 2008; Benchaar *et al.*, 2008), lo que queda demostrado en las dietas a base de heno frente a las dietas a base de forraje fresco tanto

en la pradera (Ensayo 1) como en la esparceta (Ensayo 3). Por otro lado, la inclusión de los TC en las dietas se ha asociado generalmente con una reducción en la producción *in vitro* de gas y metano (Hassanat y Benchaar, 2013; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015; Huyen *et al.*, 2016).

La inclusión de concentrado en las dietas a base heno no mostró ningún efecto sobre la producción de gas y metano, posiblemente debido al bajo contenido en proteína bruta del heno, que impide un buen acoplamiento entre la energía que aporta el concentrado y la proteína existente. Sin embargo, en un forraje de mayor calidad como el forraje fresco del Ensayo 1, la inclusión de concentrado con TC procedentes del quebracho impidió el incremento de gas y metano a diferencia de lo ocurrido con la inclusión de concentrado comercial, estando ello de acuerdo con lo observado en otros estudios (Hassanat y Benchaar, 2013; Jayanegara *et al.*, 2015).

Contradiendo la afirmación de que los TC reducen la producción de gas y metano, la alfalfa y esparceta presentaron una similar producción de gas y metano (Ensayo 2), tal y como observaron por McMahon *et al.* (1999), cuando incubaron hojas frescas de alfalfa y esparceta. Además, la adición de PEG en la esparceta tampoco afectó a estos parámetros, lo que concuerda parcialmente con los resultados de Theodoridou *et al.* (2011b), que observaron una reducción en la producción de gas pero no de metano debido a la presencia de TC. Esta diferente respuesta podría ser debida a la cantidad de TC o a la variedad de esparceta (Azuhwi *et al.*, 2011; Hatew *et al.*, 2015). Por otro lado, las diferencias en composición química y las variaciones en las fracciones de TC entre los estados fenológicos fueron insuficientes respecto a estudios previos (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b).

A pesar de tener mayor contenido en fibra, el heno de zulla presentó menor producción de gas y metano que la zulla fresca y los silos de esparceta y zulla presentaron siempre menores producciones que sus equivalente forrajes frescos (Ensayo 3). Esto podría ser debido al cambio en el contenido de las fracciones de TC. Así, la reducción en la producción de gas y metano observada en el silo de esparceta y en el heno y silo de zulla respecto a sus correspondientes forrajes frescos puede estar asociada con los altos contenidos de las fracciones de TC ligados a proteína y fibra, los cuales pueden proteger a la proteína y a la fibra frente al ataque de microorganismos ruminales (McSweeney *et al.*, 2001a; Bodas *et al.*, 2012).

1.3. Amoniaco.

El contenido de amoniaco es producto de la degradación de proteína en la dieta. Sin embargo, su contenido se puede reducir por la presencia de TC ya que éstos se unen a las proteínas, reduciendo su degradación en el rumen (Mueller-Harvey, 2006). Además, hay que tener en cuenta que el contenido en proteína influye en la formación del complejo TC-proteína, a mayor concentración de proteína mayor probabilidad de que se forme dicho complejo (Hagerman y Butler, 1981; Asquith y Butler, 1986).

La relación entre la proteína bruta de la dieta y el amoniaco queda reflejada en el mayor contenido de este último encontrado en las dietas basadas en forraje fresco frente a las de heno (Ensayo 1) y en la tendencia a disminuir con el avance del estado fenológico (Ensayo 2) debido a una reducción del 15-20% en el contenido de proteína (Guglielmelli *et al.*, 2011; Theodoridou *et al.*, 2011b). Sin embargo, el contenido en amoniaco no varió con la conservación ni en la esparceta ni en la zulla (Ensayo 3) debido, probablemente, a que las modificaciones en los contenidos de proteína entre los sustratos fueron bajas (7-13%), inferiores a las observadas entre los sustratos de los Ensayos 1 y 2 (> 20%). Al igual que en la presente Tesis, el contenido de amoniaco fue similar en el heno y el silo de esparceta cuyo contenido en proteína bruta difirió en un 3% (Scharenberg *et al.*, 2007b).

Tampoco tuvo efecto la inclusión de concentrado sobre el contenido de amoniaco en las dietas del Ensayo 1, a pesar de la variación que se produce en el contenido de proteína debido a la inclusión de concentrado en las dietas. Únicamente la inclusión de concentrado con quebracho redujo el amoniaco en el forraje fresco pero no en el heno. Esto podría ser debido a que el heno presentó un contenido en proteína bruta insuficiente para reflejar el efecto de los TC sobre el amoniaco. Cuando se añadieron 20-25 g/kg TC de quebracho a dietas con PB > 136 g/kg se redujo el amoniaco (Castro-Montoya *et al.*, 2018), mientras que otros autores no encontraron dicho efecto hasta que incluyeron 50 g/kg (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat y Benchaar, 2013).

El efecto de los TC de la esparceta sobre el contenido en amoniaco fue evidente al comparar los resultados obtenidos entre la esparceta incubada con y sin PEG (Ensayo 2). Sin embargo, la ausencia de efecto de la conservación (Ensayo 3) sobre el amoniaco a pesar de las diferencias en proteína bruta hace pensar que la diferencia en la concentración de TC libres y ligados a proteínas influyen en la protección de su

degradación. Los cambios en las características estructurales que pueden sufrir los TC por la conservación deben ser considerados, ya que cambios en la ratio PD/PC afectan a la interacción con las proteínas (Foo *et al.*, 1996; Foo *et al.*, 1997), observándose que un aumento del polímero de prodehfinidina favorece la interacción con las proteínas (Andersson *et al.*, 2006; Jonker y Yu, 2017). Esto indicaría que sería recomendable hacer un estudio de las características estructurales de los TC, para ver si algunos de estos parámetros podrían explicar las diferencias encontradas respecto al efecto de los TC sobre el contenido en amoníaco en los Ensayos 2 y 3.

1.4. Ácidos grasos volátiles.

La producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) depende fundamentalmente del tipo de carbohidratos (Getachew *et al.*, 1998). Sin embargo, dicha producción puede reducirse por la presencia de TC (Hassanat y Benchaar, 2013; Hatew *et al.*, 2015), ya que estos pueden disminuir la degradación de la dieta (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015).

Los factores evaluados afectaron de manera puntual a la producción total de AGV. En este sentido, la producción total de AGV fue similar entre las dietas a base de forraje fresco y los forrajes conservados de la pradera (Ensayo 1) y la esparceta (Ensayo 3) a pesar de presentar una composición química muy distinta (Calabrò *et al.*, 2005). La incorporación de concentrado control o con quebracho tampoco afectó a la producción de AGV en consonancia previos estudios *in vitro* cuando usaron niveles de inclusión similares al del Ensayo 1 (Zicarelli *et al.*, 2011; Hassanat y Benchaar, 2013). La alfalfa y la esparceta produjeron también similar cantidad de AGV (Ensayo 2) de acuerdo a anteriores estudios (Chung *et al.*, 2013; Toral *et al.*, 2016) y no hubo efecto de los TC de la esparceta como ya fue demostrado (Theodoridou *et al.*, 2011b; Calabrò *et al.*, 2012).

Sin embargo, el estado fenológico afectó a la producción total de AGV, presentando en los dos forrajes al inicio de floración una mayor producción, pero el comportamiento en los restantes estados fenológicos no fue igual en ambas especies forrajeras. Los sustratos con mayores producciones de AGV estuvieron correlacionadas con la DIVMO. Este efecto es difícil de explicar dado que ni la composición química ni los contenidos de las fracciones de TC mostraron notables diferencias entre los distintos estados fenológicos. La conservación afectó a la producción total de los AGV en la zulla pero no en la esparceta probablemente debido a que la variación de la composición química y los TC en la zulla fue superior. En este sentido, el silo de zulla mostró una

menor producción total de AGV que pudo estar también influenciada por un bajo contenido en TC libres y un alto contenido en TC ligados a fibra favoreciendo la fermentación hacía una mayor síntesis de proteína microbiana en detrimento a la producción de AGV (Baba *et al.*, 2002; Getachew *et al.*, 2002). Por ello, sería recomendable un estudio de las características de los TC.

La fermentación ruminal resulta más eficiente cuando es propiónica en lugar de acética, y por tanto con una ratio C₂:C₃ menor, ya que se genera menos metano, y por tanto se reducen las pérdidas energéticas (Tavendale *et al.*, 2005). Para ello se debe reducir la cantidad de hidratos de carbono estructurales y/o incluir en la dieta los TC (Beauchemin *et al.*, 2009; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2015). Las dietas basadas en forraje fresco de pradera (Ensayo 1), presentaron menor proporción en propiónico y tendió a ser menor la proporción de acético que las dietas basadas en heno, por lo que la ratio C₂:C₃ no varió. Esto podría estar determinado por el corto periodo de incubación estudiado, ya que ensayos con tiempos de incubación más prolongados (120 h) han mostrado menor proporción de propiónico en los henos que los forrajes frescos, aunque sin afectar tampoco a la ratio C₂:C₃ (Calabrò *et al.*, 2005; Calabrò *et al.*, 2006). La falta de efecto de la inclusión de concentrado en las dietas a base de forraje fresco y la reducción del propiónico e incremento de la ratio C₂:C₃ en las dietas de heno fue inesperado. Según McDonald *et al.* (2011) la inclusión de concentrado incrementa el propiónico a expensas del acético especialmente a partir de la inclusión de 40% de concentrado. Además, el corto periodo de incubación favoreció la degradación de los hidratos de carbono fácilmente degradables, mientras que los estructurales necesitan de un periodo más largo.

El menor contenido en NDF de la esparceta y alfalfa en el estado vegetativo se reflejó en la ratio C₂:C₃, que fue inferior a los del resto de estado fenológicos. La esparceta, a pesar de su menor NDF, tuvo mayor ratio C₂:C₃ que la alfalfa (Ensayo 2). También se reflejaron las diferencias en NDF en la ratio según la conservación en la zulla (Ensayo 3). Por el contrario, otros estudios con esparceta y la alfalfa fresca cuyos contenidos en NDF variaron menos del 5% presentaron similar ratio (McMahon *et al.*, 1999). Con respecto al efecto de los TC de la esparceta, en el Ensayo 2 la inclusión de PEG redujo dicha ratio. El efecto de los TC afecta de diferente manera a los tallos que a las hojas de esparceta (Theodoridou *et al.*, 2011b) por lo que la proporción de hojas y tallos podría ser responsable del diferente efecto que se ha observado en la presente Tesis. El silo de esparceta (Ensayo 3) presentó menor ratio C₂:C₃ que el heno y el forraje fresco,

mientras que el silo de zulla fue mayor que el heno y el forraje fresco. Esta diferencia entre forrajes pudo ser debida probablemente a un incremento en el contenido de NDF debido a la conservación mucho más bajo en la esparceta que en la zulla, promoviendo una fermentación menos acética y más propionica (Getachew *et al.*, 1998; Calabrò *et al.*, 2005).

El ácido valérico, iso-valérico e iso-butírico son productos de la degradación de cadenas carbonatadas de los aminoácidos (Van Soest, 1994), por lo que dependen del contenido en proteína de la dieta. Además, las proporciones de estos AGV pueden estar modificados por la presencia de TC en mayor medida que las de otros AGV, por la mayor afinidad que tienen los TC por las proteínas que por los carbohidratos (Min *et al.*, 2003; Patra y Saxena, 2009). Por ello, la presencia de TC en la dieta podría estar asociada a una reducción en la proporción de AGV de cadena ramificada debido a la reducción de la degradación proteína en el rumen (Mueller-Harvey, 2006) y/o a que los TC pueden producir un incremento de la utilización de estos AGV para la síntesis microbiana (Wegner y Foster, 1963; Martínez *et al.*, 2006).

El reflejo de la proteína bruta en las proporciones de los citados AGV quedó patente en las dietas a base de forraje fresco y de heno en la pradera (Ensayo 1), y en los estados fenológicos en la alfalfa y esparceta (Ensayo 2) (Navarro-Villa *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013). Sin embargo, las diferencias en proteína bruta en el forraje fresco, heno y silo de esparceta y zulla (Ensayo 3) debieron ser insuficientes para que se reflejaran en los citados AGV. En cuanto al efecto de los TC, se observó que la proporción de valérico se redujo cuando se incluyó concentrado con quebracho en forraje fresco mientras que dicho efecto no ocurrió cuando se incluyó concentrado control (Ensayo 1). Además, la mayor reducción numérica de los iso-ácidos al incluir en ambos forrajes el concentrado con quebracho que el concentrado control concuerda con el efecto protector de los TC de quebracho sobre la degradación de proteína (Getachew *et al.*, 2008; Hassanat y Benchaar, 2013; Castro-Montoya *et al.*, 2018). El efecto de los TC queda aún más patente en la comparación de la esparceta y la alfalfa (Ensayo 2), ya que la esparceta presentó menor proporción de valérico y de los iso-ácidos respecto a la alfalfa o la esparceta+PEG estando de acuerdo con estudios previos (Calabrò *et al.*, 2012; Hatew *et al.*, 2016; Toral *et al.*, 2016). Sin embargo, el incremento de valérico y de los iso-ácidos en los forrajes conservados comparado con el forraje fresco de zulla y esparceta (Ensayo 3) son difíciles de explicar y no concuerdan con su contenido en proteína, tal y como se

ha explicado anteriormente, ni con los de TC (Guglielmelli *et al.*, 2011; Calabrò *et al.*, 2012). En relación a ello, Scharenberg *et al.* (2007b) tampoco encontraron efectos de los TC cuando suministraron esparceta deshidratada y ensilada a corderos en ensayos *in vivo* a pesar de presentar los forrajes distinta distribución en las fracciones de TC. Por lo tanto, parece ser que la conservación podría conllevar una serie de cambios tanto en las fracciones como en las características estructurales de los TC que influyen en su efecto sobre las proporciones de AGV de cadena ramificada (Hatew *et al.*, 2016). Por lo que sería necesario llevar a cabo otro tipo de experimentos que permitieran clarificar los efectos encontrados.

2. CAROTENOIDES Y VITAMINAS LIPOSOLUBLES.

Los carotenoides y tocoferoles, presentes en mayor medida en los forrajes frescos que en los conservados o los concentrados, tienen actividad antioxidante que podría verse acentuada por la presencia de TC, como en el caso de la esparceta. Estos compuestos secundarios no pueden ser sintetizados por los animales, por lo que su presencia o la de sus metabolitos en el plasma o en los tejidos de los animales es consecuencia de su consumo a través de los alimentos. Por tanto, pueden ser usados como biomarcadores que permitan obtener la trazabilidad del sistema de alimentación que ha seguido el animal, garantizando al consumidor su procedencia. La alimentación de la oveja durante la lactación afecta a las características de la carne del cordero, como por ejemplo a la vida útil, a pesar de que los corderos tuvieron una fase final de alimentación con concentrado (Lobón *et al.*, 2017a). Con el Ensayo 4, se quiso conocer si dicho efecto pudo ser debido a la diferente deposición de carotenoides y tocoferoles en los tejidos animales, entre diferentes sistemas de alimentación durante la lactación (intensivo, alfalfa y esparceta). Además, se estudió el uso de estos compuestos para poder discriminar entre los distintos sistemas de alimentación, como herramienta de trazabilidad.

Del estudio se extrae que durante la fase de lactancia los carotenoides y tocoferoles en plasma del cordero son un reflejo de la composición en los forrajes ingeridos como ha sido descrito en otros estudios similares (Osorio *et al.*, 2008; D'Alessandro *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2015). Hubiera sido interesante realizar el estudio de los metabolitos relacionados con los carotenoides y los tocoferoles en la leche, permitiendo descifrar mejor la transferencia de dichos compuestos de la madre al cordero lactante. Hay que destacar, que el periodo de cebo durante 28 días con alimentos de

reducido contenido en carotenoides como la paja y el concentrado, no diluyó todas las diferencias entre los sistemas de alimentación. El mayor contenido de α -tocoferol en el plasma, el músculo y los depósitos grasos de los corderos de la esparceta frente a los de alfalfa pudo estar relacionado con el mayor contenido en el forraje como con una posible acción sinérgica de los TC de la esparceta (Shabtay *et al.*, 2008; Valenti *et al.*, 2019). La presencia de TC en la esparceta pudo influir incrementando el depósito de estos compuestos en los distintos tejidos de los corderos del grupo esparceta debido a la actividad antioxidante directa o indirecta que pueden ejercer los TC sobre los carotenoides y tocoferoles (Gorelik *et al.*, 2005; Halliwell *et al.*, 2005; Kerem *et al.*, 2006). Con el objetivo de poder dilucidar los posibles efectos de los metabolitos de los TC de la esparceta sobre dichos compuestos, se realizó un análisis preliminar con HPLC-ESIQ-TOF MS en la fracción polar del músculo de los corderos de alfalfa y de esparceta. Se encontraron diferencias en los metabolitos de la grasa intramuscular entre ambos tratamientos, aunque no se encontraron metabolitos de los TC de la esparceta. Sería interesante realizar el análisis del metaboloma completo. Además, se podría realizar un ensayo de alimentación de ovejas con esparceta en lactación en el cual se bloquearan los TC mediante el uso de PEG para determinar el papel de los TC.

El 100% de las muestras de plasma de los corderos alimentados en el sistema intensivo se clasificaron correctamente al destete con la concentración de luteína, retinol y tocoferoles. Sin embargo, estos analitos no permiten distinguir entre la alimentación de alfalfa y esparceta por lo que habría que buscar otros analitos presentes en el suero como los metabolitos de los TC de la esparceta o compuestos presentes únicamente en la alfalfa como el cumestrol. De igual manera, hay que buscar otros analitos o parámetros para la trazabilidad de la alimentación durante la lactación en las muestras de suero al sacrificio y los tejidos ya que el periodo de cebo interfiere para una discriminación adecuada del sistema de alimentación, siendo una herramienta más útil cuando las diferentes dietas se mantienen hasta el momento de los muestreos. Se podría mejorar e intentar conseguir una correcta clasificación combinando los contenidos en carotenoides y vitaminas liposolubles con el color o el valor absoluto de la integral del espectro de absorción (Prache *et al.*, 2003; Ripoll *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2014), ya que el uso exclusivo del color de la grasa de los corderos no permitió la correcta clasificación de las canales (Lobón *et al.*, 2019b). En este caso sería más recomendable estudiar los metabolitos de

los polifenoles en los tejidos o el perfil de ácidos grasos en el músculo y los depósitos grasos de los corderos.

3. IMPLICACIONES.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que los diferentes efectos afectaron de manera puntual a la producción total de gas y metano pero afectaron en mayor grado a la DIVMO, amoníaco y a las diferentes proporciones individuales de AGV. Del estudio de la incorporación de pienso con y sin quebracho en dietas forrajeras se puede extraer la recomendación de suplementar ambas dietas debido al incremento de la DIVMO en las dietas de heno y a la protección de la proteína en las dietas de forraje fresco.

En cuanto a la comparación entre alfalfa y esparceta, forrajes de muy alta calidad, se puede extraer que las diferencias entre ambas leguminosas son tanto debidas a diferencias en su composición química como a la presencia de TC. Ambas leguminosas presentan una fermentación interesante para el ovino en los tres estados fenológicos estudiados. Para la optimización de la utilización de las leguminosas estudiadas, sería interesante estudiar el efecto del estado fenológico, según los contenidos y características de los compuestos secundarios, sobre los rendimientos animales y la calidad de los productos.

En cuanto al aprovechamiento de la esparceta y zulla para la alimentación del ovino, parece que el silo pudiera ser más recomendable que el heno en ambas especies. Sin embargo, antes de ser recomendado deben realizarse ensayos de palatabilidad y digestibilidad *in vivo*, así como sus efectos sobre la producción y calidad de los productos del animal. Se debería estudiar la incorporación de pienso a los forrajes conservados para obtener una dieta equilibrada en proteína y energía y poder cubrir adecuadamente las necesidades de los animales en producción y reducir el coste en alimentación.

Por otro lado, la mayor concentración de carotenoides y vitaminas liposolubles en los tejidos del cordero con el aporte de forrajes frescos a la oveja durante la lactación podría permitir alargar la vida útil de dichos productos y ayudar en la trazabilidad. Así se podría certificar la alimentación de los animales y comercializar los productos bajo marcas de calidad. Si se comprueban los efectos sobre la calidad del producto se posibilitaría la venta de productos de calidad diferenciada obtenidos con leguminosas de

producción local reduciendo la dependencia de productos importados. De esta manera se incrementaría la sostenibilidad de las explotaciones de ovino de carne en las zonas mediterráneas.

VI. Conclusiones

1. La fermentación de las dietas con forraje fresco de pradera fue más eficiente que la de las dietas con heno en función de la menor producción de gas y metano y la mayor degradabilidad de la materia orgánica.
2. Los efectos de la inclusión de pienso con taninos condensados de quebracho a dosis bajas en dietas forrajeras dependen de la calidad de los forrajes. En las dietas de heno, el pienso con quebracho mejoró la eficiencia de la fermentación al incrementar la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica mientras que redujo la degradación de la proteína considerando la disminución del contenido en amoníaco y la proporción de ácido valérico en las dietas de forraje fresco.
3. Ni la composición química ni la presencia de taninos condensados de la esparceta afectaron a la producción de gas y metano en comparación con la alfalfa. Sin embargo, la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica se vio afectada por la composición química pero no por los taninos condensados al presentar la alfalfa menor degradabilidad que la esparceta independientemente de la inclusión de polietilenglicol.
4. Los taninos condensados de esparceta tuvieron un buen potencial como protectores de la proteína frente a la degradación ruminal debido al menor contenido de amoníaco y a las menores proporciones de ácido valérico, iso-valérico e iso-butírico. Además, redujeron el metano producido en relación a la producción total de ácidos grasos volátiles.
5. El estado fenológico tuvo poco efecto sobre los parámetros de la fermentación probablemente debido a la alta calidad de la alfalfa y la esparceta cuya composición química y contenido en taninos condensados varió poco entre los diferentes estados fenológicos.
6. El método de conservación afectó de forma diferente a las concentraciones de los compuestos polifenólicos de la esparceta y la zulla. La conservación afectó en mayor medida a las fracciones que al contenido total de taninos condensados, reduciéndose únicamente cuando los forrajes se ensilaron. Los dos métodos de conservación incrementaron el contenido de los taninos condensados ligados a proteína y fibra, pero únicamente el ensilado redujo el contenido en taninos condensados libres.
7. El efecto del método de conservación sobre los parámetros de la fermentación *in vitro* dependió del tipo de conservación y de la leguminosa. El ensilado podría ser considerado mejor método de conservación que el heno en ambos forrajes, teniendo en cuenta la

producción de gas y metano, la relación metano/producción total de ácidos grasos volátiles y la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica.

8. El sistema de alimentación durante la lactación influyó en las concentraciones de luteína, retinol y tocoferoles en el plasma al destete y en los tejidos del cordero. El pastoreo de alfalfa y esparceta incrementó las concentraciones de retinol en el hígado y la grasa y de α -tocoferol en el músculo y la grasa. Estas diferencias demuestran la gran importancia que tiene el sistema de alimentación durante la lactación a pesar de la fase de cebo posterior al destete.

9. El uso de luteína, retinol y tocoferoles en plasma al destete fue una excelente herramienta *in vivo* para la trazabilidad de la alimentación materna. Sin embargo, se debe mejorar la discriminación en los tejidos y en las canales.

VII. Referencias Bibliográficas

- Acamovic T. and Brooker J.D. 2005.** Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:403-412.
- Aerts R.J., Barry T.N. and McNabb W.C. 1999.** Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75:1-12.
- Agabriel J. 2010.** Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux- Valeurs des aliments: Tables Inra 2010. Édition remaniée. Quae éditions.
- Agle M., Hristov A.N., Zaman S., Schneider C., Ndegwa P.M. and Vaddella V.K. 2010.** Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93:4211-4222.
- Ahmed E., Arshad M. and Khan M.Z. 2017.** Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6:205-214.
- Aissa A., Manolaraki F., Ben Salem H., Kraiem K. and Hoste H. 2015a.** Effect of three extracts of Tunisian legume forage on the exsheathment process of *Haemonchus contortus* infective stage. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research* 2:1097-1101.
- Aissa A., Manolaraki F., Ben Salem H., Kraiem K. and Hoste H. 2015b.** *In vitro* anthelmintic activity of Tunisian fabaceae (*Hedysarum coronarium* L., ecotype Bikra 21) against *Haemonchus*. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)* 7:103-110.
- Aissa A., Manolaraki F., Ben Salem H., Hoste H. and Kraiem K. 2016.** *In vitro* assessment of the anthelmintic activity of *Hedysarum carnosum* Desf. at different phenological stages and from six locations in Tunisia. *Parasitology* 143:778-786.
- Albrecht K. and Muck R. 1991.** Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. *Crop Science* 31:464-469.
- Alvarez-Rodriguez J., Sanz A., Ripoll-Bosch R. and Joy M. 2010.** Do alfalfa grazing and lactation length affect the digestive tract fill of light lambs? *Small Ruminant Research* 94:109-116.
- Álvarez-Rodríguez J., Sanz A., Delfa R., Revilla R. and Joy M. 2007.** Performance and grazing behaviour of Churra Tensina sheep stocked under different management systems during lactation on Spanish mountain pastures. *Livestock Science* 107:152-161.
- Álvarez-Rodríguez J., Sanz A., Ripoll-Bosch R. and Joy M. 2010.** Do alfalfa grazing and lactation length affect the digestive tract fill of light lambs? *Small Ruminant Research* 94:109-116.
- Álvarez del Pino M.C., Frutos P., Hervás G., Gómez A., Giráldez F.J. and Mantecón A.R. 2001.** Efecto del contenido de taninos en la degradación ruminal *in vitro* de varios órganos de especies arbustivas.
- Álvarez del Pino M.C., Hervás G., Mantecón A.R., Giráldez F.J. and Frutos P. 2005.** Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrub species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:583-590.

- Álvarez R., Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M. and Alcalde M.J. 2014.** Effect of pasture and concentrate diets on concentrations of carotenoids, vitamin A and vitamin E in plasma and adipose tissue of lambs. *Journal of Food Composition and Analysis* 36:59-65.
- Álvarez R., Meléndez-Martínez A., Vicario I. and Alcalde M. 2015.** Carotenoid and vitamin A contents in biological fluids and tissues of animals as an effect of the diet: A review. *Food Reviews International* 31:319-340.
- Ammar H., López S., Bochi-Brum O., García R. and Ranilla M.J. 1999.** Composition and *in vitro* digestibility of leaves and stems of grasses and legumes harvested from permanent mountain meadows at different stages of maturity. *Journal of Animal and Feed Sciences* 8:599-610.
- Andersson M.S., Lascano C.E., Schultze - Kraft R. and Peters M. 2006.** Forage quality and tannin concentration and composition of a collection of the tropical shrub legume *Flemingia macrophylla*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1023-1031.
- AOAC. 2000.** Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- AOCS. 2005.** Approved procedure Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. AOCS Press, Urbana, USA.
- Arana A., Soret B., Mendizabal J.A., Corroza M., Eguinoa P. and Purroy A. 1998.** Changes in adipose tissue accumulation in Rasa Aragonesa breed lambs during growth and fattening. *Animal Science* 66:409-413.
- Arbabi S., Ghoorchi T. and Ramzanpour S. 2017.** Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate the nutritive value of five forage to concentrate ratios. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 7:249-257.
- Archimède H., Sauvant D., Hervieu J., Ternois F. and Poncet C. 1996.** Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Animal Feed Science and Technology* 58:267-282.
- Arnett A., Dikeman M., Spaeth C., Johnson B. and Hildabrand B. 2007.** Effects of vitamin A supplementation in young lambs on performance, serum lipid, and longissimus muscle lipid composition. *Journal of Animal Science* 85:3062-3071.
- Arroquy J.I., Cornacchione M., Colombatto D. and Kunst Jr C. 2014.** Chemical composition and *in vitro* ruminal degradation of hay and silage from tropical grasses. *Canadian Journal of Animal Science* 94:705-715.
- Asadian A. and Mézes M. 1996.** Effects of vitamins A and E supplementation on vitamins A and E status of blood plasma, liver and tail fat of fat-tailed sheep. *Small Ruminant Research* 23:1-6.
- Asquith T.N. and Butler L.G. 1986.** Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry* 25:1591-1593.
- Athanasiadou S. and Kyriazakis I. 2004.** Plant secondary metabolites: Antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society* 63:631-639.

- Aufrère J., Dudilieu M. and Poncet C. 2008.** *In vivo* and *in situ* measurements of the digestive characteristics of sainfoin in comparison with lucerne fed to sheep as fresh forages at two growth stages and as hay. *animal* 2:1331-1339.
- Azuhnwi B., Boller B., Martens M., Dohme-Meier F., Ampuero S., Günter S., Kreuzer M. and Hess H. 2011.** Morphology, tannin concentration and forage value of 15 Swiss accessions of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as influenced by harvest time and cultivation site. *Grass and Forage Science* 66:474-487.
- Azuhnwi B., Hertzberg H., Arrigo Y., Gutzwiller A., Hess H., Mueller-Harvey I., Torgerson P., Kreuzer M. and Dohme-Meier F. 2013a.** Investigation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) cultivar differences on nitrogen balance and fecal egg count in artificially infected lambs. *Journal of Animal Science* 91:2343-2354.
- Azuhnwi B.N., Boller B., Dohme-Meier F., Hess H., Kreuzer M., Stringano E. and Mueller-Harvey I. 2013b.** Exploring variation in proanthocyanidin composition and content of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2102-2109.
- Baba A., Castro F. and Ørskov E. 2002.** Partitioning of energy and degradability of browse plants *in vitro* and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science and Technology* 95:93-104.
- Bae H.D., McAllister T.A., Yanke J., Cheng K.-J. and Muir A. 1993.** Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2132-2138.
- Bal M.A., Ozturk D., Aydin R., Erol A., Ozkan C.O., Ata M., Karakas E. and Karabay P. 2006.** Nutritive value of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*) harvested at different maturity stages. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9:205-209.
- Ballet N., Robert J.C. and Williams P.E.V. 2000.** Vitamins in forages. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*: 399-431.
- Barahona R., Sánchez S., Lascano C.E., Owen E., Morris P. and Theodorou M.K. 2006.** Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 39:281-288.
- Barry T.N. and Manley T.R. 1984.** The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. II. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition* 51:493-504.
- Barry T.N. 1985.** The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. Rates of body and wool growth. *British Journal of Nutrition* 54:211-217.
- Barry T.N., Manley T.R. and Duncan S.J. 1986.** The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. *British Journal of Nutrition* 55:123-137.
- Barry T.N. and McNabb W.C. 1999.** The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81:263-272.

- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martinez T.F. and McAllister T.A. 2007.** Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 85:1990-1996.
- Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'Mara F. and McAllister T.A. 2008.** Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:21-27.
- Beauchemin K.A., McAllister T.A. and McGinn S.M. 2009.** Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4:1-18.
- Beeckman A., Vicca J., Van Ranst G., Janssens G. and Fievez V. 2010.** Monitoring of vitamin E status of dry, early and mid-late lactating organic dairy cows fed conserved roughages during the indoor period and factors influencing forage vitamin E levels. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94:736-746.
- Beever D.E., Baker M., Crush J. and Humphreys L. 1993.** Ruminant animal production from forages—present position and future opportunities. *M. Baker M.(Eded.) Grassland for our World. SIR Publishing, Wellington.*
- Beever D.E. and Thorp C. 1996.** Advances in the understanding of factors influencing the nutritive value of legumes. *Legumes in Sustainable Farming Systems* 30:194-207.
- Ben Jeddi F. 2005.** *Hedysarum coronarium* L.: Variation génétique, création variétale et place dans les rotations tunisiennes, Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées. Faculté des sciences en bio-ingénierie. Université de Gen (Belgique).
- Ben Salem H. 1998.** Effets de l'acacia cyanophylla lindl. Sur l'ingestion et la digestion des regimes destines aux ovins. Roles des tanins et perspectives d'amélioration de sa valeur alimentaire. Thèse de doctorat. Université de Dijon (France).
- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. and Beauchemin K.A. 2008.** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145:209-228.
- Benito B., Gómez S.R. and San Miguel A. 2000.** Especies de gramíneas y leguminosas de interés pastoral: morfología y características ecológicas y pascícolas. Fundación Conde del Valle de Salazar.
- Bento M.H.L., Makkar H.P.S. and Acamovic T. 2005.** Effect of mimosa tannin and pectin on microbial protein synthesis and gas production during *in vitro* fermentation of ¹⁵N-labelled maize shoots. *Animal Feed Science and Technology* 123-124:365-377.
- Bergman E., Reid R., Murray M.G., Brockway J. and Whitelaw F. 1965.** Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochemical Journal* 97:53-58.
- Bernués A., Olaizola A. and Corcoran K. 2003.** Labelling information demanded by European consumers and relationships with purchasing motives, quality and safety of meat. *Meat science* 65:1095-1106.
- Bernués A., Ruiz R., Olaizola A., Villalba D. and Casasús I. 2011.** Sustainability of pasture-based livestock farming systems in the European Mediterranean context: Synergies and trade-offs. *Livestock Science* 139:44-57.

- Bertolín J., Joy M., Rufino-Moya P., Lobón S. and Blanco M. 2018.** Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, retinol and cholesterol in ovine lyophilised samples of milk, meat, and liver and in unprocessed/raw samples of fat. *Food Chemistry* 257:182-188.
- Berzal N., Pina A., Alvarez R., Panea B., Córdoba M. and Alcalde M. 2015.** Efecto del tipo de pasto sobre el contenido en retinol y tocoferol en leche y sangre de cabras y en sangre de cabritos de raza Payoya. In: Proceedings of the XL SEOC. p. 222-226.
- Bjørneboe A., Bjørneboe G.-E.A. and Drevon C.A. 1990.** Absorption, transport and distribution of vitamin E. *the Journal of Nutrition* 120:233-242.
- Black A.D., Laidlaw A.S., Moot D.J. and O'Kiely P. 2009.** Comparative growth and management of white and red clovers. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48:149-166.
- Blanco M., Casasús I., Ripoll G., Panea B., Albertí P. and Joy M. 2010.** Lucerne grazing compared with concentrate-feeding slightly modifies carcass and meat quality of young bulls. *Meat science* 84:545-552.
- Blanco M., Joy M., Ripoll G., Sauerwein H. and Casasús I. 2011.** Grazing lucerne as fattening management for young bulls: technical and economic performance and diet authentication. *animal* 5:113-122.
- Blaner W.S., Obunike J.C., Kurlandsky S.B., Al-Haideri M., Piantedosi R., Deckelbaum R.J. and Goldberg I.J. 1994.** Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *Journal of Biological Chemistry* 269:16559-16565.
- Blomhoff R., Green M.H., Green J.B., Berg T. and Norum K.R. 1991.** Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiological Reviews* 71:951-990.
- Blomhoff R. and Blomhoff H.K. 2006.** Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology* 66:606-630.
- Blum J.W., Hadorn U., Sallmann H.-P. and Schuep W. 1997.** Delaying colostrum intake by one day impairs plasma lipid, essential fatty acid, carotene, retinol and α -tocopherol status in neonatal calves. *The Journal of Nutrition* 127:2024-2029.
- Blümmel M., Makkar H. and Becker K. 1997.** *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77:24-34.
- Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F.J. and López S. 2012.** Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176:78-93.
- Bohlmann J. and Keeling C.I. 2008.** Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal* 54:656-669.
- Bonanno A., Di Miceli G., Di Grigoli A., Frenda A.S., Tornambè G., Giambalvo D. and Amato G. 2011.** Effects of feeding green forage of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) on lamb growth and carcass and meat quality. *animal* 5:148-154.
- Bonanno A., Di Grigoli A., Mazza F., De Pasquale C., Giosuè C., Vitale F. and Alabiso M. 2016.** Effects of ewes grazing sulla or ryegrass pasture for different

- daily durations on forage intake, milk production and fatty acid composition of cheese. *animal* 10:2074-2082.
- Borel P., Drai J., Faure H., Fayol V., Galabert C., Laromiguière M. and Le Moël G. 2005.** Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Annales de Biologie Clinique* 63:165-177.
- Borreani G., Peiretti P.G. and Tabacco E. 2003.** Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in the spring growth cycle. *Agronomie* 23:193-201.
- Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A. and Wagner K.-H. 2000.** Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:913-938.
- Britton G. 1995.** UV/visible spectroscopy. *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy* :20-21.
- Broadhurst R.B. and Jones W.T. 1978.** Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29:788-794.
- Buccioni A., Pauselli M., Viti C., Minieri S., Pallara G., Roscini V., Rapaccini S., Marinucci M.T., Lupi P., Conte G. and Mele M. 2015.** Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. *Journal Dairy Science* 98:1145-1156.
- Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones R.L. 2000.** Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, MD.
- Bueno I.C.S., Vitti D.M.S.S., Louvandini H. and Abdalla A.L. 2008.** A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 141:153-170.
- Bueno I.C.S., Brandi R.A., Franzolin R., Benetel G., Fagundes G.M., Abdalla A.L., Louvandini H. and Muir J.P. 2015.** *In vitro* methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Animal Feed Science and Technology* 205:1-9.
- Bues A., Preißel S., Reckling M., Zander P., Kuhlmann T., Topp K., Watson C., Lindström K., Stoddard F.L. and Murphy-Bokern D. 2013.** The environmental role of protein crops in the new Common Agricultural Policy. *The Environmental Role of Protein Crops in the New Common Agricultural Policy*.
- Burggraaf V., Kemp P., Thom E., Waghorn G., Woodfield D. and Woodward S. 2003.** Agronomic evaluation of white clover selected for increased floral condensed tannin. In: Proceedings of the New Zealand Grassland Association. p 139-145.
- Bustamante J., Allés A., Espadas M. and Muñoz J. 2000.** El cultivo de la zulla en menorca (III): Zulla, Boletín de Información Técnica. Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahón (Menorca). N° 20.
- Bustamante J., Allés, A., De Olives. J.R., y Rovira, J. 2005.** Valoración bromatológica del ensilado de zulla (*Hedysarum coronarium* L.) de zullares cultivados en la isla de Menorca. In: Proceedings of the XLV Reunión Científica de la SEEP (Sesión: Producción Animal) I. p 153-159.

- Cahoon E.B., Hall S.E., Ripp K.G., Ganzke T.S., Hitz W.D. and Coughlan S.J. 2003.** Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21:1082.
- Calabrò S., Cutrignelli M.I., Bovera F., Piccolo G. and Infascelli F. 2005.** *In vitro* fermentation kinetics of carbohydrate fractions of fresh forage, silage and hay of *Avena sativa*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1838-1844.
- Calabrò S., Carone F., Cutrignelli M.I., D'Urso S., Piccolo G., Tudisco R., Angelino G. and Infascelli F. 2006.** The effect of haymaking on the neutral detergent soluble fraction of two intercropped forages cut at different growth stages. *Italian Journal of Animal Science* 5:327-339.
- Calabrò S., Guglielmelli A., Iannaccone F., Danieli P.P., Tudisco R., Ruggiero C., Piccolo G., Cutrignelli M.I. and Infascelli F. 2012.** Fermentation kinetics of sainfoin hay with and without PEG. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96:842-849.
- Capper J.L., Wilkinson R.G., Kasapidou E., Pattinson S.E., Mackenzie A.M. and Sinclair L.A. 2005.** The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. *British Journal of Nutrition* 93:549-557.
- Cardinault N., Doreau M., Poncet C. and Noziere P. 2006.** Digestion and absorption of carotenoids in sheep given fresh red clover. *Animal Science* 82:49-55.
- Carulla J.E., Kreuzer M., Machmüller A. and Hess H.D. 2005.** Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 56:961-970.
- Casasús I., Bernués A., Sanz A., Villalba D., Riedel J. and Revilla R. 2007.** Vegetation dynamics in Mediterranean forest pastures as affected by beef cattle grazing. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121:365-370.
- Castro-Montoya J., Westreicher-Kristen E., Henke A., Diaby M., Susenbeth A. and Dickhoefer U. 2018.** *In vitro* microbial protein synthesis, ruminal degradation and post-ruminal digestibility of crude protein of dairy rations containing quebracho tannin extract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102:77-86.
- Cavallarín L., Antoniazzi S., Borreani G. and Tabacco E. 2005.** Effects of wilting and mechanical conditioning on proteolysis in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) wilted herbage and silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:831-838.
- Clarke R.T.J. and Reid C.S.W. 1974.** Foamy Bloat of Cattle. A Review. *Journal of Dairy Science* 57:753-785.
- Clauss M., Gehrke J., Hatt J.-M., Dierenfeld E.S., Flach E.J., Hermes R., Castell J., Streich W.J. and Fickel J. 2005.** Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 140:67-72.
- Combs Jr G. 1976.** Differential effects of high dietary levels of vitamin A on the vitamin E-selenium nutrition of young and adult chickens. *The Journal of nutrition* 106:967-975.
- Condron K.N., Lemenager R.P., Claeys M.C., Lipkie T.E. and Schoonmaker J.P. 2014.** Supplemental β -carotene I: Effect on plasma vitamin A, growth,

- performance, and carcass characteristics of feedlot cattle. *Meat science* 98:736-743.
- Cook B.G., Pengelly B.C., Brown S., Donnelly J., Eagles D., Franco M., Hanson J., Mullen B.F., Partridge I. and Peters M. 2005.** Tropical forages: an interactive selection tool. Web Tool. CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia.
- Copani G., Niderkorn V., Anglard F., Quereuil A. and Ginane C. 2016.** Silages containing bioactive forage legumes: a promising protein-rich feed source for growing lambs. *Grass and Forage Science* 71:622-631.
- Craig W.J. 1997.** Phytochemicals: guardians of our health. *Journal of the American Dietetic Association* 97:199-204.
- Crozier A., Clifford M.N. and Ashihara H. 2008.** Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.
- Cuesta P., McDowell L., Kunkle W., Wilkinson N. and Martin F. 1995.** Effects of high-dose prepartum injections of Se and vitamin E on milk and serum concentrations in ewes. *Small Ruminant Research* 18:99-103.
- Cushnahan A. and Gordon F. 1995.** The effects of grass preservation on intake, apparent digestibility and rumen degradation characteristics. *Animal Science* 60:429-438.
- Chaney A.L. and Marbach E.P. 1962.** Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8:130-132.
- Chapagain T. and Riseman A. 2015.** Nitrogen and carbon transformations, water use efficiency and ecosystem productivity in monocultures and wheat-bean intercropping systems. *Nutrient cycling in agroecosystems* 101:107-121.
- Charlier C. 2003.** La traçabilité comme un standard de production. *Economie rurale* 275:5-18.
- Chaudhry A.S. and Khan M.M.H. 2012.** Impacts of different spices on *in vitro* rumen dry matter disappearance, fermentation and methane of wheat or ryegrass hay based substrates. *Livestock Science* 146:84-90.
- Chauveau-Duriot B., Doreau M., Noziere P. and Graulet B. 2010.** Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:777-790.
- Chiquette J., Cheng K.J., Costerton J.W. and Milligan L.P. 1988.** Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Canadian Journal of Animal Science* 68:751-760.
- Christie W. 2010.** Tocopherols and Tocotrienols-Structure, Composition, Biology and Analysis. *Scottish Crop Research Institute, Scotland, lipidlibrary. aocs. org* retrieved on Monday 23:2010.
- Chung Y.H., Mc Geough E.J., Acharya S., McAllister T.A., McGinn S.M., Harstad O.M. and Beauchemin K.A. 2013.** Enteric methane emission, diet digestibility, and nitrogen excretion from beef heifers fed sainfoin or alfalfa. *Journal of Animal Science* 91:4861-4874.

- D'Alessandro A.G., Maiorano G., Kowalyszyn B., Loiudice P. and Martemucci G. 2012.** How the nutritional value and consumer acceptability of suckling lambs meat is affected by the maternal feeding system. *Small Ruminant Research* 106:83-91.
- Darwish W.S., Ikenaka Y., Morshdy A.E., Eldesoky K.I., Nakayama S., Mizukawa H. and Ishizuka M. 2016.** β -carotene and retinol contents in the meat of herbivorous ungulates with a special reference to their public health importance. *Journal of Veterinary Medical Science* 78:351-354.
- Dawson J.M., Buttery P.J., Jenkins D., Wood C.D. and Gill M. 1999.** Effects of dietary quebracho tannin on nutrient utilisation and tissue metabolism in sheep and rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1423-1430.
- Dawson R. and Hemington N. 1974.** Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *British Journal of Nutrition* 32:327-340.
- De Brito G.F., Ponnampalam E.N. and Hopkins D.L. 2017.** The effect of extensive feeding systems on growth rate, carcass traits, and meat quality of finishing lambs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16:23-38.
- De Koning C., Yates R. and Wurst M. 2008.** Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) Managent Package. *Produced by SARDI. Available online at:* http://www.sardi.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0019/136441/sardi_sulla_booklet_v5.pdf (*Website accessed: March 2015*).
- De Koning C., Schutz P. and Humphries A. 2010.** Performance of sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) based pastures in southern Australia. *Proceedings of 15th Agronomy Conference 2010.* http://www.regional.org.au/au/asa/2010/farming-systems/animal-feed-quality/6990_dekoningct.htm.
- De Oliveira L., Carvalho P. and Prache S. 2012.** Response of lamb plasma carotenoid concentration to a shift from a low to a high dietary carotenoid level. *animal* 6:1139-1142.
- Debier C. and Larondelle Y. 2005.** Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 93:153-174.
- Debier C., Pottier J., Goffe C. and Larondelle Y. 2005.** Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science* 98:135-147.
- Decandia M., Cabiddu A., Sitzia M. and Molle G. 2008.** Polyethylene glycol influences feeding behaviour of dairy goats browsing on bushland with different herbage cover. *Livestock Science* 116:183-190.
- Delgado I., Andrés C. and Muñoz F. 2008.** Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. In: C Porqueddu and MM Tavares de Sousa, editors, Sustainable Mediterranean grasslands and their multi-functions. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens No. 79. Zaragoza : CIHEAM / FAO / ENMP / SPPF. p. 199-202.
- Delgado I., Muñoz F. and Demdoun S. 2010.** Evolution of the feeding value of sainfoin as affected by the phenological development. *Cahiers options mediterraneennes* 92:193-198.

- Delgado I., Muñoz F. and Andueza D. 2014.** Evaluación comparativa de la alfalfa y la esparceta, en condiciones de secano y regadío de Aragón. *Pastos y PAC* 2020:304-310.
- DellaPenna D. 2005.** A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* 162:729-737.
- Den Hertog-Meischke M.J.A., Smulders F.J.M., Houben J.H. and Eikelenboom G. 1997.** The effect of dietary vitamin E supplementation on drip loss of bovine Longissimus lumborum, psoas major and Semitendinosus muscles. *Meat science* 45:153-160.
- Dentinho M.T.P., Bessa R., Belo C. and Ribeiro J. 2006.** Effect of preservation method on the nutritive value of sulla (*Hedysarum coronarium*). *Sustainable grassland productivity* (ed. J Lloveras, A Gonzales-Rodriguez, O Vasquez-Yanez, J Pineiro, O Santamaria, L Olea, MJ Poblaciones) 11:252-254.
- Dentinho M.T.P., Belo A. and Bessa R. 2014.** Digestion, ruminal fermentation and microbial nitrogen supply in sheep fed soybean meal treated with *Cistus ladanifer* L. tannins. *Small Ruminant Research* 119:57-64.
- Dentinho M.T.P., Moreira O.C. and Bessa R.J. 2018.** The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in *Cistus ladanifer* L. *Forest Systems* 27:04.
- Descalzo A., Insani E.M., Biolatto A., Sancho A.M., Garcia P.T. and Pensel N.A. 2005.** Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat science* 70.
- Deshpande S. and Salunkhe D. 1982.** Interactions of tannic acid and catechin with legume starches. *Journal of Food Science* 47:2080-2081.
- Dewhurst R.J., Delaby L., Moloney A., Boland T. and Lewis E. 2009.** Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* :167-187.
- Dewick P.M. 2002.** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons.
- Dey A. and De P.S. 2014.** Influence of condensed tannins from *Ficus bengalensis* leaves on feed utilization, milk production and antioxidant status of crossbred cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27:342-348.
- Di Trana A., Bonanno A., Cecchini S., Giorgio D., Di Grigoli A. and Claps S. 2015.** Effects of Sulla forage (*Hedysarum coronarium* L.) on the oxidative status and milk polyphenol content in goats. *Journal of Dairy Science* 98:37-46.
- Dian P., Andueza D., Barbosa C., Amoureux S., Jestin M., Carvalho P., Prado I. and Prache S. 2007a.** Methodological developments in the use of visible reflectance spectroscopy for discriminating pasture-fed from concentrate-fed lamb carcasses. *animal* 1:1198-1208.
- Dian P., Chauveau-Duriot B., Prado I. and Prache S. 2007b.** A dose-response study relating the concentration of carotenoid pigments in blood and reflectance spectrum characteristics of fat to carotenoid intake level in sheep. *Journal of Animal Science* 85:3054-3061.

- Doane P.H., Pell A.N. and Schofield P. 1997.** The effect of preservation method on the neutral detergent soluble fraction of forages. *Journal of Animal Science* 75:1140-1148.
- Dønne I., Randby Å.T., Hektoen L., Avdem F., Meling S., Våge Å.Ø., Ådnøy T., Steinheim G. and Waage S. 2015.** Effect of vitamin E supplementation to ewes in late pregnancy on the rate of stillborn lambs. *Small Ruminant Research* 125:154-162.
- Donoghue S., Kronfeld D.S. and Sklan D. 1983.** Retinol homeostasis in lambs given low and high intakes of vitamin A. *British Journal of Nutrition* 50:235-248.
- Douglas G., Stienezen M., Waghorn G., Foote A. and Purchas R. 1999.** Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lambs in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42:55-64.
- Duke S.O., Scheffler B.E., Dayan F.E., Weston L.A. and Ota E. 2001.** Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops. *Weed Technology* 15:826-834.
- Dunne P., Monahan F., O'Mara F. and Moloney A. 2009.** Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat science* 81:28-45.
- During A., Dawson H.D. and Harrison E.H. 2005.** Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in caco-2 cells treated with ezetimibe. *Journal of Nutrition* 135:2305-2312.
- Egesel C.Ö., Gül M.K., Kahrıman F., Özer İ. and Türk F. 2008.** The effect of nitrogen fertilization on tocopherols in rapeseed genotypes. *European Food Research and Technology* 227:871-880.
- Eggleston S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. and Tanabe K. 2006.** IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Institute for Global Environmental Strategies Hayama, Japan. https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/support/Primer_2006GLs.pdf
- Eicher S., Morrill J. and Blecha F. 1994.** Vitamin concentration and function of leukocytes from dairy calves supplemented with vitamin A, vitamin E, and β -carotene *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 77:560-565.
- Elgersma A., Søegaard K. and Jensen S.K. 2013.** Fatty acids, α -tocopherol, β -carotene, and lutein contents in forage legumes, forbs, and a grass-clover mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:11913-11920.
- Elgersma A., Søegaard K. and Jensen S.K. 2015.** Interrelations between herbage yield, α -tocopherol, β -carotene, lutein, protein, and fiber in non-leguminous forbs, forage legumes, and a grass-clover mixture as affected by harvest date. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:406-414.
- Engström M.T., Päljjarvi M., Fryganas C., Grabber J.H., Mueller-Harvey I. and Salminen J.-P. 2014.** Rapid qualitative and quantitative analyses of proanthocyanidin oligomers and polymers by UPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:3390-3399.

- Estévez Santiago R. 2016.** Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Fernandez S.C., Budowski P., Ascarelli I., Neumark H. and Bondi A. 1976.** Pre-intestinal stability of beta-carotene in ruminants. *International journal for vitamin and nutrition research* 46:439-445.
- Foley W., Iason G. and McArthur C. 1999.** Role of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores: how far have we come in 25 years? *In: 7th International Symposium on the Nutrition of Herbivores.* p. 130-209.
- Foo L.Y. and Porter L.J. 1980.** The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* 19:1747-1754.
- Foo L.Y., Newman R., Waghorn G., McNabb W. and Ulyatt M. 1996.** Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 41:617-624.
- Foo L.Y., Lu Y., McNabb W., Waghorn G. and Ulyatt M. 1997.** Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* 45:1689-1696.
- Foster J.L., Carter J.N., Sollenberger L.E., Blount A.R., Myer R.O., Maddox M.K., Phatak S.C. and Adesogan A.T. 2011.** Nutritive value, fermentation characteristics, and *in situ* disappearance kinetics of ensiled warm-season legumes and bahiagrass. *Journal of Dairy Science* 94:2042-2050.
- Foster K. 2010.** Sulla (*Hedysarum coronarium*). Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth (Australia).
- Frame J., Charlton J. and Laidlaw A.S. 1998.** Temperate forage legumes. Cab International.
- Frame J. and Laidlaw S. 2005.** Prospects for temperate forage legumes. *Grasslands: Development, Opportunities, Perspectives*:1-28.
- France J., Dijkstra J., Dhanoa M.S., Lopez S. and Bannink A. 2000.** Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: Derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition* 83:143-150.
- Frutos P., Hervas G., Ramos G., Giraldez F. and Mantecón A. 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., Hervas G., Giráldez F. and Mantecón A. 2004a.** Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2:191-202.
- Frutos P., Hervás G., Giráldez F.J. and Mantecón A.R. 2004b.** 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.
- Fry J.M., Smith G.M., McGrath M.C., Speijers E.J. and Allen J.G. 1993.** Plasma and tissue concentrations of α -tocopherol during vitamin E depletion in sheep. *British Journal of Nutrition* 69:225-232.

- Fu H., Xie B., Ma S., Zhu X., Fan G. and Pan S. 2011.** Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*). *Journal of Food Composition and Analysis* 24:288-297.
- Gallardo B., Manca M.G., Mantecón A.R., Nudda A. and Manso T. 2015.** Effects of linseed oil and natural or synthetic vitamin E supplementation in lactating ewes' diets on meat fatty acid profile and lipid oxidation from their milk fed lambs. *Meat science* 102:79-89.
- Gea A., Stringano E., Brown R.H. and Mueller-Harvey I. 2010.** *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high-throughput germplasm screening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:495-503.
- Gentili A., Caretti F., Bellante S., Ventura S., Canepari S. and Curini R. 2012.** Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:1628-1639.
- Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A. and Tempio G. 2013.** Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/3/i3437e/i3437e00.htm>
- Getachew G., Blümmel M., Makkar H.P.S. and Becker K. 1998.** *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 72:261-281.
- Getachew G., Makkar H.P.S. and Becker K. 2000.** Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition* 84:73-83.
- Getachew G., Pittroff W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S. and DePeters E.J. 2008.** The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology* 140:444-461.
- Girard M., Dohme-Meier F., Silacci P., Ampuero Kragten S., Kreuzer M. and Bee G. 2016.** 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* 96:1923-1933.
- Girard M., Dohme-Meier F., Ampuero-Kragten S., Grosse-Brinkhaus A., Arrigo Y., Wyss U. and Bee G. 2018.** Modification of the proportion of extractable and bound condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sainfoin (*Onobrychis viicifolia*) during wilting, ensiling and pelleting processes. *Biotechnology in Animal Husbandry* 34:1-19.
- Giweli A.A., Džamić A.M., Soković M., Ristić M., Janačković P. and Marin P. 2013.** The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences* 65:321-329.
- Gladine C., Rock E., Morand C., Bauchart D. and Durand D. 2007.** Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single

- acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition* 98:691-701.
- Gobert M., Gruffat D., Habeanu M., Parafita E., Bauchart D. and Durand D. 2010.** Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat science* 85:676-683.
- Goldberg G. 2008.** Plants: Diet and health. John Wiley & Sons.
- González-Calvo L., Ripoll G., Molino F., Calvo J.H. and Joy M. 2015.** The relationship between muscle α -tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:103-110.
- Gonzalez-Hidalgo J.C., Brunetti M. and de Luis M. 2010.** Precipitation trends in Spanish hydrological divisions, 1946–2005. *Climate Research* 43:215-228.
- Goñi I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto F., Rebole A., Arija I. and Estevez R. 2007.** Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry science* 86:508-516.
- Gorelik S., Lapidot T., Shaham I., Granit R., Ligumsky M., Kohen R. and Kanner J. 2005.** Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3397-3402.
- Grabber J.H., Zeller W.E. and Mueller-Harvey I. 2013.** Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol-HCl-iron assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2669-2678.
- Graham J., Cullen B., Lodge G., Andrew M., Christy B., Holst P., Wang X., Murphy S. and Thompson A. 2003.** SGS Animal Production Theme: effect of grazing system on animal productivity and sustainability across southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 43:977-991.
- Grainger C., Clarke T., Auldism M., Beauchemin K., McGinn S., Waghorn G. and Eckard R.J. 2009.** Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 89:241-251.
- Graulet B., Piquet M., Duriot B., Pradel P., Hulin S., Cornu A., Portelli J., Martin B. and Farruggia A. 2012.** Variations in the micronutrient content of grass in medium-altitude grassland and transfer to milk. *Fourrages* 209:59-68.
- Gray F.V. and Pilgrim A.F. 1952.** Origins of the volatile fatty acids in the rumen. *Nature* 170:375-376.
- Grosse-Brinkhaus A., Wyss U., Arrigo Y., Girard M., Bee G., Zeitz J.O., Kreuzer M. and Dohme-Meier F. 2017.** *In vitro* ruminal fermentation characteristics and utilisable CP supply of sainfoin and birdsfoot trefoil silages and their mixtures with other legumes. *animal* 11:580-590.
- Guglielmelli A., Calabrò S., Primi R., Carone F., Cutrignelli M.I., Tudisco R., Piccolo G., Ronchi B. and Danieli P.P. 2011.** *In vitro* fermentation patterns and methane production of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hay with different condensed tannin contents. *Grass and Forage Science* 66:488-500.

- Guidera J., Kerry J., Buckley D., Lynch P. and Morrissey P. 1997.** The effect of dietary vitamin E supplementation on the quality of fresh and frozen lamb meat. *Meat science* 45:33-43.
- Hagerman A.E. and Butler L.G. 1978.** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26:809-812.
- Hagerman A.E. and Butler L.G. 1981.** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 256:4494-4497.
- Hagerman A.E. 1987.** Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology* 13:437-449.
- Hagerman A.E. 1988.** Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology* 14:453-461.
- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W. and Riechel T.L. 1998.** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1887-1892.
- Halliwell B., Rafter J. and Jenner A. 2005.** Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American journal of clinical nutrition* 81:268-276.
- Harborne J.B. 2013.** The flavonoids: advances in research since 1980. Springer.
- Hartmann T. 1991.** Alkaloids In herbivores; their interaction with secondary plant metabolites, Vol. I, The chemical participants, Edn 2, GA Rosenthaland MR Berenbaum. Academic press, San Diego.
- Hartmann T. 2007.** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68:2831-2846.
- Haslam E. 2007.** Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68:2713-2721.
- Hassanat F. and Benchaar C. 2013.** Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:332-339.
- Hatew B., Carbonero C.H., Stringano E., Sales L.F., Smith L.M.J., Mueller-Harvey I., Hendriks W.H. and Pellikaan W.F. 2015.** Diversity of condensed tannin structures affects rumen *in vitro* methane production in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) accessions. *Grass and Forage Science* 70:474-490.
- Hatew B., Stringano E., Mueller-Harvey I., Hendriks W.H., Carbonero C.H., Smith L.M.J. and Pellikaan W.F. 2016.** Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100:348-360.
- Hatfield D.L. and Gladyshev V.N. 2002.** How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and Cellular Biology* 22:3565-3576.

- Havaux M., Eymery F., Porfirova S., Rey P. and Dörmann P. 2005.** Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17:3451-3469.
- Heinritz S.N., Martens S.D., Avila P. and Hoedtke S. 2012.** The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology* 174:201-210.
- Hervás G., Frutos P., Giráldez F.J., Mantecón Á.R. and Álvarez Del Pino M.C. 2003a.** Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology* 109:65-78.
- Hervás G., Pérez V., Giráldez F.J., Mantecón A.R., Almar M.M. and Frutos P. 2003b.** Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology* 129:44-54.
- Hess H.D., Tiemann T.T., Noto F., Carulla J.E. and Kreuzer M. 2006.** Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock International Congress Series No. 1293. p 164-167.
- Hidiroglou M. 1987.** Vitamin E levels in sheep tissues at various times after a single oral administration of d-alpha-tocopherol acetate. *International journal for vitamin and nutrition research* 57:381-384.
- Hidiroglou N., McDowell L., Papas A., Antapli M. and Wilkinson N. 1992.** Bioavailability of vitamin E compounds in lambs. *Journal of Animal Science* 70:2556-2561.
- Hixson J.L., Bindon K.A. and Smith P.A. 2015.** Evaluation of direct phloroglucinolysis and colorimetric depolymerization assays and their applicability for determining condensed tannins in grape marc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:9954-9962.
- Hofmann T., Glabasnia A., Schwarz B., Wisman K.N., Gangwer K.A. and Hagerman A.E. 2006.** Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9503-9509.
- Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S.M. and Hoskin S.O. 2006.** The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 22:253-261.
- Huang Q.Q., Jin L., Xu Z., Acharya S., McAllister T.A., Hu T.M., Iwaasa A., Schellenberg M., Peng K. and Y. W. 2016.** Effects of conservation method on condensed tannin content, ruminal degradation, and *in vitro* intestinal digestion of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.). *Canadian Journal of Animal Science* 96:524-531.
- Huang Y., Andueza D., de Oliveira L., Zawadzki F. and Prache S. 2015.** Visible spectroscopy on carcass fat combined with chemometrics to distinguish pasture-fed, concentrate-fed and concentrate-finished pasture-fed lambs. *Meat Science* 101:5-12.
- Huyen N., Fryganas C., Uittenbogaard G., Mueller-Harvey I., Verstegen M., Hendriks W. and Pellikaan W. 2016.** Structural features of condensed tannins affect *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *The Journal of Agricultural Science* 154:1474-1487.

- Hymøller L. and Jensen S.K. 2010.** Vitamin D₃ synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *Journal of Dairy Science* 93:2025-2029.
- Iason G., Hartley S. and Duncan A. 1993.** Chemical composition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): do responses to fertilizer vary with phenological stage? *Biochemical Systematics and Ecology* 21:315-321.
- Iason G., Hodgson J. and Barry T. 1995.** Variation in condensed tannin concentration of a temperate grass (*Holcus lanatus*) in relation to season and reproductive development. *Journal of Chemical Ecology* 21:1103-1112.
- Iason G. 2005.** The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:123-131.
- Iglesias J., Pazos M., Torres J.L. and Medina I. 2012.** Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol. *Food Chemistry* 134:1767-1774.
- Jayanegara A., Leiber F. and Kreuzer M. 2012.** Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96:365-375.
- Jayanegara A., Goel G., Makkar H.P.S. and Becker K. 2015a.** Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 209:60-68.
- Jayanegara A., Makkar H.P.S. and Becker K. 2015b.** Addition of purified tannin sources and polyethylene glycol treatment on methane emission and rumen fermentation *in vitro*. *Media Peternakan* 38:57-63.
- Jerónimo E., Pinheiro C., Lamy E., Dentinho M.T., Sales-Baptista E., Lopes O. and Capela e Silva F. 2016.** Tannins in ruminant nutrition: Impact on animal performance and quality of edible products, Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties. p. 121-168.
- Jin L., Wang Y., Iwaasa A., Xu Z., Schellenberg M., Zhang Y., Liu X. and McAllister T. 2012.** Effect of condensed tannins on ruminal degradability of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) harvested at two growth stages. *Animal Feed Science and Technology* 176:17-25.
- Jin Q., Cheng H., Wan F., Bi Y., Liu G., Liu X., Zhao H., You W., Liu Y. and Tan X. 2015.** Effects of feeding β -carotene on levels of β -carotene and vitamin A in blood and tissues of beef cattle and the effects on beef quality. *Meat Science* 110:293-301.
- Johansen M., Lund P. and Weisbjerg M.R. 2018.** Feed intake and milk production in dairy cows fed different grass and legume species: a meta-analysis. *animal* 12:66-75.
- Johnson K.A. and Johnson D.E. 1995.** Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483-2492.
- Jones G., McAllister T., Muir A. and Cheng K.-J. 1994.** Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1374-1378.

- Jonker A. and Yu P. 2017.** The occurrence, biosynthesis, and molecular structure of proanthocyanidins and their effects on legume forage protein precipitation, digestion and absorption in the ruminant digestive tract. *International journal of molecular sciences* 18:1105.
- Joseph R., Tanner G. and Larkin P. 1998.** Proanthocyanidin synthesis in the forage legume *Onobrychis viciifolia*. A study of chalcone synthase, dihydroflavonol 4-reductase and leucoanthocyanidin 4-reductase in developing leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25:271-278.
- Journet M. 1993.** Perspectives de valorisation des grandes légumineuses par les herbivores. Intérêt zootechnique et qualité des produits animaux (Prospects for the utilization of large legumes by grazing animals. Interest for animal husbandry and quality of animal products). *Fourrages* 134:229-241.
- Joy M., Sanz A., Ripoll G., Panea B., Ripoll-Bosch R., Blasco I. and Alvarez-Rodriguez J. 2012.** Does forage type (grazing vs. hay) fed to ewes before and after lambing affect suckling lambs performance, meat quality and consumer purchase intention? *Small Ruminant Research* 104:1-9.
- Judson G.J., Babidge P.J. and Babidge W.J. 1991.** Plasma, liver and fat alpha-tocopherol concentrations in sheep given various oral and subcutaneous doses of vitamin E. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31:45-50.
- Julkunen-Tiitto R. 1985.** Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33:213-217.
- Jung M.Y. 2011.** Effects of green tea catechin on the lipid oxidation, volatile compound formation, and losses of retinol and α -tocopherol in whole milk during light illumination as compared with ascorbic acid. *Food Science and Biotechnology* 20:1425-1434.
- Kalač P. 2012.** Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *Journal of Agrobiology* 29:1-13.
- Kalu B.A. and Fick G.W. 1981.** Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. *Crop Science* 21:267-271.
- Kaplan M. 2011.** Determination of potential nutritive value of sainfoin (*Onobrychis sativa*) hays harvested at flowering stage. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10:2028-2031.
- Kasapidou E., Enser M., Wood J., Richardson R., Wilkinson R. and Sinclair L. 2009.** Influence of vitamin E supplementation and basal diet on the vitamin E status, performance and tissue fatty acid concentration in lambs. *animal* 3:516-526.
- Kasapidou E., Wood J.D., Richardson R.I., Sinclair L.A., Wilkinson R.G. and Enser M. 2012.** Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. *Meat science* 90:908-916.
- Kasimanickam R.K., Kasimanickam V.R., Haldorson G.J. and Tibary A. 2012.** Effect of tocopherol supplementation during last trimester of pregnancy on mRNA abundances of interleukins and angiogenesis in ovine placenta and uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10.

- Kelman W. and Tanner G. 1990.** Foliar condensed tannin levels in *Lotus* species growing on limed and unlimed soils in South-Eastern Australia. In: Proceedings of the New Zealand Grasslands Association. p 51-54.
- Kerem Z., Chetrit D., Shoseyov O. and Regev-Shoshani G. 2006.** Protection of lipids from oxidation by epicatechin, *trans*-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:10288-10293.
- Khalilvandi-Behroozyar H., Dehghan-Banadaky M. and Rezayazdi K. 2010.** Palatability, *in situ* and *in vitro* nutritive value of dried sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural Science* 148:723-733.
- King C., McEniry J., Richardson M. and O'Kiely P. 2012.** Yield and chemical composition of five common grassland species in response to nitrogen fertiliser application and phenological growth stage. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science* 62:644-658.
- King T.B., Lohman T.G. and Smith G.S. 1962.** Evidence of rumino-reticular losses of vitamin A and carotene. *Journal of Animal Science* 21:1002.
- Kleen J., Taube F. and Gierus M. 2011.** Agronomic performance and nutritive value of forage legumes in binary mixtures with perennial ryegrass under different defoliation systems. *The Journal of Agricultural Science* 149:73-84.
- Klongsiriwet C., Quijada J., Williams A.R., Mueller-Harvey I., Williamson E.M. and Hoste H. 2015.** Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5:127-134.
- Kobeisy M., Boehm J., Dirl G., Holtershinken M. and Leibetseder J. 1999.** The influence of tannin on rumen metabolism using RUSITEC. *Journal of Animal Science* 77: 87.
- Kobeisy M., Boehm J., Buchner A. and Leibetseder J. 2000.** The effect of tannin on milk yield and some blood constituents in dairy cattle. *Assiut Veterinary Medical Journal* 43:86-94.
- Koupai-Abyazani M.R., McCallum J., Muir A.D., Lees G.L., Bohm B.A., Towers G. and Gruber M.Y. 1993.** Purification and characterization of a proanthocyanidin polymer from seed of alfalfa (*Medicago sativa* cv. Beaver). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:565-569.
- Koutsoumpas A., Giadinis N., Lafi S., Petridou E., Karatzia M.-A. and Karatzias H. 2013.** Serum vitamin A and vitamin E concentrations after parenteral vitamin A administration in sheep. *Small ruminant research* 109:28-30.
- Krause D.O., Smith W.J., Brooker J.D. and McSweeney C.S. 2005.** Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 121:59-75.
- Kumar R. and Singh M. 1984.** Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:447-453.
- Kumar S., Dagar S.S., Sirohi S.K., Upadhyay R.C. and Puniya A.K. 2013.** Microbial profiles, *in vitro* gas production and dry matter digestibility based on various ratios of roughage to concentrate. *Annals of Microbiology* 63:541-545.

- Kurilich A.C. and Juvik J.A. 1999.** Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1948-1955.
- Kuśnierczyk A., Winge P., Midelfart H., Armbruster W.S., Rossiter J.T. and Bones A.M. 2007.** Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Experimental Botany* 58:2537-2552.
- Larraín R., Schaefer D., Richards M. and Reed J. 2008.** Finishing steers with diets based on corn, high-tannin sorghum or a mix of both: Color and lipid oxidation in beef. *Meat science* 79:656-665.
- Larsen M.K., Fretté X.C., Kristensen T., Eriksen J., Søegaard K. and Nielsen J.H. 2012.** Fatty acid, tocopherol and carotenoid content in herbage and milk affected by sward composition and season of grazing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:2891-2898.
- Lascano C.E., Schmidt A. and Barahona Rosales R. 2001.** Forage quality and the environment.
https://www.researchgate.net/publication/242712617_Forage_quality_and_the_environment
- Lattanzio V. 2013.** Phenolic compounds: introduction, Natural products. Springer. p. 1543-1580.
- Lee J.H., Waller J.C., Yilmaz Y. and Melton S.L. 2007a.** Effect of feeding rumen-protected dietary protein–oil supplements on fatty acid composition and α -tocopherol content of blood serum and muscle lipids of lambs. *Small ruminant research* 72:101-110.
- Lee J.H., Waller J.C. and Melton S.L. 2007b.** Distribution of fatty acids and effect of chemically treated ground, full-fat soybean supplements on tocopherols concentrations in crossbred (Dorset×Suffolk) lambs. *Small Ruminant Research* 68:269-278.
- Lees G., Gruber M. and Suttill N. 1995.** Condensed tannins in sainfoin. II. Occurrence and changes during leaf development. *Canadian journal of Botany* 73:1540-1547.
- Leinmüller E., Steingass H. and Menke K.H. 1991.** Tannins in ruminant feedstuffs. *Animal research and development* 33:9-62.
- Leto G., Todaro M., Di Noto A.M. and Alicata M.L. 2002.** Comparison of Sulla-hay and Sulla-silage in the lactating ewes and their effects on milk and cheese characteristics. *Small Ruminant Research* 45:301-306.
- Li X., Chen D., Wang G. and Lu Y. 2013.** Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: ascorbic acid, alpha-tocopherol, and proanthocyanidins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 70:22-36.
- Li Y., Iwaasa A., Wang Y., Jin L., Han G. and Zhao M. 2014.** Condensed tannins concentration of selected prairie legume forages as affected by phenological stages during two consecutive growth seasons in western Canada. *Canadian journal of plant science* 94:817-826.

- Lindqvist H., Nadeau E. and Jensen S.K. 2012.** α -tocopherol and β -carotene in legume-grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science* 67:119-128.
- Lindqvist H., Nadeau E., Jensen S.K. and Søgaard K. 2014.** α -tocopherol and β -carotene contents of forage species in a four-cut system. *Grass and Forage Science* 69:356-364.
- Livingston A.L., Smith D., Carnahan H.L., Knowles R.E., Nelson J.W. and Kohler G.O. 1968.** Variation in the xanthophyll and carotene content of lucerne, clovers and grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19:632-636.
- Lobón S., Molino F., Legua M., Eseverri P., Cespedes M. and 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* 54:14-17.
- Lobón S., Blanco M., Sanz A., Ripoll G., Bertolín J.R. and Joy M. 2017a.** Meat quality of light lambs is more affected by the dam's feeding system during lactation than by the inclusion of quebracho in the fattening concentrate. *Journal of Animal Science* 95:4998-5011.
- Lobón S., Sanz A., Blanco M. and Joy M. 2017b.** Efecto del tipo de forraje y la inclusión de quebracho en la dieta de ovejas lactantes sobre sus rendimientos productivos. *ITEA. Información Técnica Económica Agraria* 113:359-375.
- Lobón S., Sanz A., Blanco M., Ripoll G. and Joy M. 2017c.** The type of forage and condensed tannins in dams' diet: influence on meat shelf life of their suckling lambs. *Small ruminant research* 154:115-122.
- Lobón S., Joy M., Sanz A., Álvarez-Rodríguez J. and Blanco M. 2019a.** The fatty acid composition of ewe milk or suckling lamb meat can be used to discriminate between ewes fed different diets. *Animal Production Science* 59:1108-1118.
- Lobón S., Blanco M., Sanz A., Ripoll G. and Joy M. 2019b.** Effects of feeding strategies during lactation and the inclusion of quebracho in the fattening on performance and carcass traits in light lambs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99:457-463.
- López-Andrés P., Luciano G., Vasta V., Gibson T.M., Biondi L., Priolo A. and Mueller-Harvey I. 2013.** Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. *British Journal of Nutrition* 110:632-639.
- López-Andrés P., Luciano G., Vasta V., Gibson T.M., Scerra M., Biondi L., Priolo A. and Mueller-Harvey I. 2014.** Antioxidant effects of ryegrass phenolics in lamb liver and plasma. *animal* 8:51-57.
- Lorenz M.M., Eriksson T. and Udén P. 2010.** Effect of wilting, silage additive, PEG treatment and tannin content on the distribution of N between different fractions after ensiling of three different sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties. *Grass and Forage Science* 65:175-184.
- Lorenz M.M., Alkhafadji L., Stringano E., Nilsson S., Mueller-Harvey I. and Udén P. 2014.** Relationship between condensed tannin structures and their ability to precipitate feed proteins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94:963-968.

- Lotito S.B. and Fraga C.G. 2000.** Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225:32-38.
- Luciano G., Monahan F.J., Vasta V., Biondi L., Lanza M. and Priolo A. 2009.** Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science* 81:120-125.
- Luciano G., Vasta V., Monahan F.J., Lopez-Andres P., Biondi L., Lanza M. and Priolo A. 2011.** Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of longissimus dorsi muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chemistry* 124:1036-1042.
- Luciano G., Roscini V., Mattioli S., Ruggeri S., Gravador R., Natalello A., Lanza M., De Angelis A. and Priolo A. 2017.** Vitamin E is the major contributor to the antioxidant capacity in lambs fed whole dried citrus pulp. *animal* 11:411-417.
- Lyan B., Azaïs-Braesco V., Cardinault N., Tyssandier V., Borel P., Alexandre-Gouabau M.C. and Grolier P. 2001.** Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 751:297-303.
- MAGRAMA. 2017.** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística Avance 2016.
- Mahmood S., Khan A.M., Sarwar M., Nisa M., Lee W., Kim S., Hur T., Lee H. and Kim H. 2007.** Use of chemical treatments to reduce tannins and trypsin inhibitor contents in salseed (*Shorea robusta*) meal. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20:1462-1467.
- Majak W., Hall J. and McCaughey W. 1995.** Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. *Journal of Animal Science* 73:1493-1498.
- Makkar H.P.S., Singh B. and Dawra R. 1988.** Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *British Journal of Nutrition* 60:287-296.
- Makkar H.P.S., Dawra R.K. and Singh B. 1991.** Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54:513-519.
- Makkar H.P.S. and Singh B. 1992.** Detannification of oak (*Quercus incana*) leaves: treatments and their optimization. *Animal Feed Science and Technology* 36:113-127.
- Makkar H.P.S. and Singh B. 1993.** Effect of storage and urea addition on detannification and *in sacco* dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*) leaves. *Animal Feed Science and Technology* 41:247-259.
- Makkar H.P.S., Blümmel M. and Becker K. 1995.** Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition* 73:897-913.
- Makkar H.P.S., Blümmel M. and Becker K. 1997.** *In vitro* rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. *Animal Feed Science and Technology* 67:245-251.

- Makkar H.P.S. 2000.** Quantification of Tannins in Tree Foliage. *FAO/IAEA Working Document IAEA, Vienna (Austria).*
- 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. *FAO/IAEAA Publication, Rome (Italy).*
- Makkar H.P.S. 2005.** Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniniferous tree foliage: Achievements, result implications, and future research. *Animal Feed Science and Technology* 122:3-12.
- Martin C., Morgavi D.P. and Doreau M. 2010.** Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *animal* 4:351-365.
- Martin M.M., Rockholm D.C. and Martin J.S. 1985.** Effects of surfactants, pH, and certain cations on precipitation of proteins by tannins. *Journal of Chemical Ecology* 11:485-494.
- Martínez M.E., Ranilla M.J., Tejido M.L., Saro C. and Carro M.D. 2010.** The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Animal Feed Science and Technology* 158:126-135.
- Martínez T.F., McAllister T.A., Wang Y. and Reuter T. 2006.** Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1244-1256.
- Mauricio R.M., Owen E., Mould F.L., Givens I., Theodorou M.K., France J., Davies D.R. and Dhanoa M.S. 2001.** Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology* 89:33-48.
- Mazid M., Khan T.A. and Mohammad F. 2011.** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3:232-249.
- McAllister T.A., Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.J. and Muir A. 1994.** Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 40:298-305.
- McDonald P., Edwards R., Greenhalgh J., Morgan C., Sinclair L. and Wilkinson R. 2011.** *Animal Nutrition.* Essex. Prentice Hall, Pearson.
- McDowell L.R. 2000.** Reevaluation of the metabolic essentiality of the vitamins-review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 13:115-125.
- McDowell L.R., Williams S.N., Hidiroglou N., Njeru C.A., Hill G.M., Ochoa L. and Wilkinson N.S. 1996.** Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science and Technology* 60:273-296.
- McLeod M. 1974.** Plant tannins-their role in forage quality. In: *Nutrition Abstract Review* 44. p 803-815.

- McMahon L., Majak W., McAllister T., Hall J., Jones G., Popp J. and Cheng K.-J. 1999.** Effect of sainfoin on *in vitro* digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science* 79:203-212.
- McMahon L., McAllister T., Berg B., Majak W., Acharya S., Popp J., Coulman B., Wang Y. and 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., Palmer B., Bunch R. and Krause D.O. 1999.** *In vitro* quality assessment of tannin-containing tropical shrub legumes: Protein and fibre digestion. *Animal Feed Science and Technology* 82:227-241.
- McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D. and Krause D. 2001a.** Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91:83-93.
- McSweeney C.S., Palmer B., Bunch R. and Krause D.O. 2001b.** Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology* 90:78-88.
- Mène-Saffrané L. and Pellaud S. 2017.** Current strategies for vitamin E biofortification of crops. *Current Opinion in Biotechnology* 44:189-197.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D. and Schneider W. 1979.** The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science* 93:217-222.
- Menke K.H. and Steingass H. 1988.** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development* 28:7-55.
- Min B.R., Fernandez J.M., Barry T.N., McNabb W.C. and Kemp P.D. 2001.** The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology* 92:185-202.
- Min B.R., Attwood G.T, Reilly K., Sun W., Peters J., Barry T.N. and McNabb W.C. 2002.** *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology* 48:911-921.
- Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T. and McNabb W.C. 2003.** The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology* 106:3-19.
- Minnee E., Woodward S., Waghorn G. and Laboyrie P. 2002.** The effect of ensiling forage legumes on condensed tannins. *Agronomy New Zealand* 32:117-119.
- Mole S., Ross J.A. and Waterman P.G. 1988.** Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. *Journal of Chemical Ecology* 14:1-21.
- Molle G., Decandia M., Fois N., Ligios S., Cabiddu A. and 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.

- Molle G., Decandia M., Sölter U., Greef J., Rochon J., Sitzia M., Hopkins A. and Rook A. 2008.** The effect of different legume-based swards on intake and performance of grazing ruminants under Mediterranean and cool temperate conditions. *Grass and Forage Science* 63:513-530.
- Molle G., Decandia M., Giovanetti V., Cabiddu A., Fois N. and Sitzia M. 2009.** Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep: Part 1: Effects on feeding behaviour, intake, diet digestibility and performance. *Livestock Science* 123:138-146.
- Montossi F., Font-i-Furnols M., del Campo M., San Julián R., Brito G. and Sañudo C. 2013.** Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat science* 95:772-789.
- Moñino I., Martínez C., Sotomayor J.A., Lafuente A. and Jordán M.J. 2008.** Polyphenols transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3363-3367.
- Mora O., Romano J.L., González E., Ruiz F.J. and Shimada A. 1999.** *In vitro* and *in situ* disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:273-276.
- Morand-Fehr P. and Sauvant D. 1987.** Feeding strategies in goats. *Proceedings of the 4th International Conference on Goats* 2:1275-1303.
- Morris P., Carron T., Robbins M. and Webb K. 1993.** Distribution of condensed tannins in flowering plants of *Lotus corniculatus* var. japonicus and tannin accumulation by transformed root cultures. *Lotus Newsletter* 24:60-63.
- Moseley G. and Jones J. 1984.** The physical digestion of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) in the foregut of sheep. *British Journal of Nutrition* 52:381-390.
- Mueller-Harvey I. and McAllan A. 1992.** Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology* 1:151-217.
- Mueller-Harvey I. 1999.** Tannins: their nature and biological significance. *Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding (Caygill JC and Mueller-Harvey I., eds.). Nottingham Univ Press (UK)* :17-70.
- 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., Bee G., Dohme-Meier F., Hoste H., Karonen M., Kölliker R., Lüscher A., Niderkorn V., Pellikaan W.F., Salminen J.-P., Sköt L., Smith L.M.J., Thamsborg S.M., Totterdell P., Wilkinson I., Williams A.R., Azuhwi B.N., Baert N., Brinkhaus A.G., Copani G., Desrues O., Drake C., Engström M., Fryganas C., Girard M., Huyen N.T., Kempf K., Malisch C., Mora-Ortiz M., Quijada J., Ramsay A., Ropiak H.M. and Waghorn G.C. 2019.** Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration, and diet composition. *Crop Science* 59:1-25.

- Muño I., Apeleo E., de la Fuente J., Pérez-Santaescolástica C., Rivas-Cañedo A., Pérez C., Díaz M.T., Cañeque V. and Lauzurica S. 2014.** Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality. *Meat science* 98:116-123.
- Müller C., Möller J., Jensen S.K. and Udén P. 2007.** Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. *Animal Feed Science and Technology* 137:182-197.
- Narvaez N., Brosh A., Mellado M. and Pittroff W. 2011.** Performance of sheep and goats fed *Arctostaphylos canescens* with and without polyethylene glycol supplementation. *Rangeland Ecology & Management* 64:85-91.
- Naumann H., Muir J., Lambert B., Tedeschi L. and Kothmann M. 2013.** Condensed tannins in the ruminant environment: A perspective on biological activity. *Journal of Agricultural Sciences* 1:8-20.
- Navarro-Villa A., O'Brien M., López S., Boland T.M. and O'Kiely P. 2011.** *In vitro* rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology* 168:152-164.
- Niderkorn V., Mueller-Harvey I., Le Morvan A. and Aufrère J. 2012.** Synergistic effects of mixing cocksfoot and sainfoin on *in vitro* rumen fermentation. Role of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 178:48-56.
- Niezen J.H., Waghorn. G.C., Lyons. T.B. and Corson. D.C. 1998.** The potential benefits of ensiling the forage legume sulla compared with pasture. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 60:105-109.
- Njeru C.A., McDowell L.R., Wilkinson N.S., Linda S.B. and Williams S.N. 1994.** Pre- and postpartum supplemental DL-alpha-tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *Journal of Animal Science* 72:1636-1640.
- Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P. and Doreau M. 2006.** Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131:418-450.
- O'donovan L. and Brooker J.D. 2001.** Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (S. caprinus) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 147:1025-1033.
- Ochoa L., McDowell L., Williams S., Wilkinson N., Boucher J. and Lentz E. 1992.** alpha-tocopherol concentrations in serum and tissues of sheep fed different sources of vitamin E. *Journal of Animal Science* 70:2568-2573.
- Olives G. 1967.** La zulla. Publicaciones de Capacitación Agraria. Serie Técnica, num. 23. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Olmedilla-Alonso B., Jiménez-Colmenero F. and Sánchez-Muniz F.J. 2013.** Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat science* 95:919-930.
- Orlandi T., Kozloski G., Alves T., Mesquita F. and Ávila S. 2015.** Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Animal Feed Science and Technology* 210:37-45.

- Oroian M. and Escriche I. 2015.** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 74:10-36.
- Osorio M.T., Zumalacárregui J.M., Cabeza E.A., Figueira A. and Mateo J. 2008.** Effect of rearing system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat. *Small Ruminant Research* 78:1-12.
- Park Y.W., Anderson M.J., Walters J.L. and Mahoney A.W. 1983.** Effects of processing methods and agronomic variables on carotene contents in forages and predicting carotene in alfalfa hay with near-infrared-reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 66:235-245.
- Patra A.K. and Saxena J. 2009.** The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews* 22:204-219.
- Patra A.K. and Saxena J. 2010.** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1198-1222.
- Patra A.K. and Saxena J. 2011.** Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:24-37.
- Pazos M., Torres J.L., Andersen M.L., Skibsted L.H. and Medina I. 2009.** Galloylated polyphenols efficiently reduce alpha-tocopherol radicals in a phospholipid model system composed of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5042-5048.
- Pearce K., Masters D., Smith G., Jacob R. and Pethick D. 2005.** Plasma and tissue α -tocopherol concentrations and meat colour stability in sheep grazing saltbush (*Atriplex* spp.). *Australian Journal of Agricultural Research* 56:663-672.
- Pedreira M.d.S., Oliveira S.G.d., Primavesi O., Lima M.A.d., Frighetto R.T.S. and Berchielli T.T. 2013.** Methane emissions and estimates of ruminal fermentation parameters in beef cattle fed different dietary concentrate levels. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42:592-598.
- Perez-Maldonado R.A., Norton B.W. and Kerven G.L. 1995.** Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69:291-298.
- Pérez T.M. 1994.** La zulla. Nuevas areas de cultivo. *Pastagens e Forragens* 15:173-187.
- Peyraud J.L., Le Gall A. and Lüscher A. 2009.** Potential food production from forage legume-based-systems in Europe: An overview. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48:115-135.
- Phelan P., Moloney A., McGeough E., Humphreys J., Bertilsson J., O’Riordan E. and O’Kiely P. 2015.** Forage legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34:281-326.
- Piccaglia R., Gaspari F. and Vecchiellini M. 2003.** Characterisation of an Italian wild sulla (*Hedysarum coronarium* L.). In: Optimal forage systems for animal production and the environment. Proceedings of the 12th Symposium of the European Grassland Federation, Pleven, Bulgaria, 26-28 May 2003. p 441-444.

- Piluzza G., Bullitta S., Deroma M. and Odoardi M. 2000.** The accumulation of condensed tannins in local populations of *sulla*. *Cahiers options mediterraneennes* 45:199-202.
- Piluzza G. and Bullitta S. 2010.** The dynamics of phenolic concentration in some pasture species and implications for animal husbandry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:1452-1459.
- Piluzza G., Sulas L. and Bullitta S. 2014.** Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: A review. *Grass and Forage Science* 69:32-48.
- Pinski B., Günal M. and Abughazaleh A.A. 2016.** The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. *Animal Production Science* 56:1707-1713.
- Piñeiro-Vázquez A.T., Canul-Solís J.R., Alayón-Gamboa J.A., Chay-Canul A.J., Ayala-Burgos A.J., Aguilar-Pérez C.F., Solorio-Sánchez F.J. and Ku-Vera J.C. 2015.** Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity. *Archivos de Medicina Veterinaria* 47:263-272.
- Poncet-Legrand C., Edelmann A., Putaux J.-L., Cartalade D., Sarni-Manchado P. and Vernhet A. 2006.** Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 20:687-697.
- Ponnampalam E.N., Burnett V.F., Norng S., Warner R.D. and Jacobs J.L. 2012.** Vitamin E and fatty acid content of lamb meat from perennial pasture or annual pasture systems with supplements. *Animal Production Science* 52:255-262.
- Ponnampalam E.N., Burnett V.F., Norng S., Hopkins D.L., Plozza T. and Jacobs J.L. 2016.** Muscle antioxidant (vitamin E) and major fatty acid groups, lipid oxidation and retail colour of meat from lambs fed a roughage based diet with flaxseed or algae. *Meat science* 111:154-160.
- Porter L.J., Hrstich L.N. and Chan B.G. 1985.** The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Prache S., Priolo A. and Grolier P. 2003a.** Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: Its significance for the traceability of grass-feeding. *Journal of Animal Science* 81:360-367.
- Prache S., Priolo A. and Grolier P. 2003b.** Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: Its significance for discriminating grass-fed, concentrate-fed and concentrate-finished grazing lambs. *Animal Science* 77:225-233.
- Prache S., Cornu A., Berdagué J.L. and Priolo A. 2005.** Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59:157-168.
- Prache S., Kondjoyan N., Delfosse O., Chauveau-Duriot B., Andueza D. and Cornu A. 2009.** Discrimination of pasture-fed lambs from lambs fed dehydrated alfalfa indoors using different compounds measured in the fat, meat and plasma. *animal* 3:598-605.

- Price M.L., Stromberg A.M. and Butler L.G. 1979.** Tannin content as a function of grain maturity and drying conditions in several varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27:1270-1274.
- Prigent S.V., Voragen A.G., Visser A.J., van Koningsveld G.A. and Gruppen H. 2007.** Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:2502-2510.
- Priolo A., Prache S., Micol D. and Agabriel J. 2002.** Reflectance spectrum of adipose tissue to trace grass feeding in sheep: Influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal of Animal Science* 80:886-891.
- Przemyslaw S., Cezary P., Stanislaw M., Krzysztof L., Barbara P., Zofia A., Maja F., Katarzyna Ż. and Ząbek K. 2015.** The effect of nutritional and fermentational characteristics of grass and legume silages on feed intake, growth performance and blood indices of lambs. *Small Ruminant Research* 123:1-7.
- Quijada J., Drake C., Gaudin E., El-Korso R., Hoste H. and Mueller-Harvey I. 2018.** Condensed tannin changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:2136-2142.
- Radović J., Sokolović D. and Marković J. 2009.** Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25:465-475.
- Ramírez-Restrepo C.A., Barry T.N., Pomroy W., López-Villalobos N., McNabb W.C. and Kemp P.D. 2005a.** Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase summer lamb growth under commercial dryland farming conditions with minimal anthelmintic drench input. *Animal Feed Science and Technology* 122:197-217.
- Ramírez-Restrepo C.A. and Barry T.N. 2005b.** Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120:179-201.
- Ramírez-Restrepo C.A., Barry T.N., López-Villalobos N., Kemp P.D. and Harvey T.G. 2005c.** Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. *Animal Feed Science and Technology* 121:23-43.
- Ramírez M.C. and Quiles J.L. 2005.** Vitamina C, vitamina E y coenzima Q. *Tratado de nutrición, Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*: 481-500.
- Ramos G., Mantecón Á.R., de Frutos Fernández P. and García F.J.G. 1998.** Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos de Zootecnia* 47:1.
- Rasmussen S.E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K. and Poulsen L. 2005.** Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 49:159-174.
- Real Decreto 53. 2013.** de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros

- finés científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado* 34:11370-11421.
- Real Decreto 1075. 2014.** de 19 de diciembre, sobre la aplicación a partir de 2015 de los pagos directos a la agricultura y a la ganadería y otros regímenes de ayuda, así como sobre la gestión y control de los pagos directos y de los pagos al desarrollo rural. *Boletín Oficial del Estado* 307:103644-103723.
- Reglamento CE N° 1099. 2009.** de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza. *Diario Oficial de la Unión Europea* 303:1-30.
- Ribeiro G.O., Teixeira A.M., Velasco F.O., Faria W.G., Pereira L.G.R., Chaves A.V., Gonçalves L.C. and McAllister T.A. 2014.** Production, nutritional quality and *in vitro* methane production from *Andropogon Gayanus* grass harvested at different maturities and preserved as hay or silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27:330-341.
- Ripoll-Bosch R., Joy M. and Bernués A. 2014a.** Role of self-sufficiency, productivity and diversification on the economic sustainability of farming systems with autochthonous sheep breeds in less favoured areas in Southern Europe. *animal* 8:1229-1237.
- Ripoll-Bosch R., Joy M., Sanz A., Blasco I., Ripoll G. and Álvarez-Rodríguez J. 2014b.** Effect of concentrate supplementation and prolificacy on the productive and economic performance of autochthonous sheep breeds fed forage-based diets. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12:1099-1104.
- Ripoll G., Joy M., Muñoz F. and Albertí P. 2008.** Meat and fat colour as a tool to trace grass-feeding systems in light lamb production. *Meat Science* 80:239-248.
- Ripoll G., González-Calvo L., Molino F., Calvo J.H. and Joy M. 2013.** Effects of finishing period length with vitamin E supplementation and alfalfa grazing on carcass color and the evolution of meat color and the lipid oxidation of light lambs. *Meat Science* 93:906-913.
- Rira M., Morgavi D.P., Archimède H., Marie-Magdeleine C., Popova M., Bousseboua H. and Doreau M. 2015.** Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science* 93:334-347.
- Rochette P. and Janzen H.H. 2005.** Towards a revised coefficient for estimating N₂O emissions from legumes. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 73:171-179.
- Rochfort S., Parker A.J. and Dunshea F.R. 2008.** Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69:299-322.
- Rochon J., Doyle C., Greef J., Hopkins A., Molle G., Sitzia M., Scholefield D. and Smith C. 2004.** Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science* 59:197-214.
- Rodríguez-Amaya D.B. 2001.** A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press Washington.
- Rodríguez R., Frutos P. and Fondevila M. 2015.** A new index to estimate reactivity and biological effect of tannins, using tropical browse legumes as a model. *Animal Feed Science and Technology* 205:42-48.

- Rogosic J., Pfister J.A., Provenza F.D. and Grbesa D. 2006.** Sheep and goat preference for and nutritional value of Mediterranean maquis shrubs. *Small Ruminant Research* 64:169-179.
- Röhrle F.T., Moloney A.P., Black A., Osorio M.T., Sweeney T., Schmidt O. and Monahan F.J. 2011.** α -Tocopherol stereoisomers in beef as an indicator of vitamin E supplementation in cattle diets. *Food Chemistry* 124:935-940.
- Romero-Huelva M., Martín-García A.I., Nogales R. and Molina-Alcaide E. 2013.** The effects of feed blocks containing tomato and cucumber by-products on *in vitro* ruminant fermentation, microbiota, and methane production. *Journal of Animal and Feed Sciences* 22:229-237.
- Rotz C.A. and Abrams S. 1988.** Losses and quality changes during alfalfa hay harvest and storage. *Transactions of the ASAE* 31:350-0355.
- Rozbicka-Wieczorek A.J., Wiesyk E., Krajewska-Bienias K.A., Wereszka K. and Czauderna M. 2016.** Supplementation effects of seleno-compounds, carnolic acid, and fish oil on concentrations of fatty acids, tocopherols, cholesterol, and amino acids in the livers of lambs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 40:681-693.
- Rufino-Moya P., Blanco M., Lobón S., Joy M. and Pérez-Jiménez J. 2017.** Effect of grazing on sainfoin or alfalfa during lactation on lamb's muscle metabolites. A HPLC-ESI-QTOF MS approach. In: *Proceedings of the 63rd International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST). Nurturing Locally, Growing Globally.* p 826-828.
- Rufino-Moya P.J., Blanco M., Bertolín J.R. and Joy M. 2019.** Effect of the method of preservation on the chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics in two legumes rich in condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 251:12-20.
- Russell J. 1998.** The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 81:3222-3230.
- Salem A., Salem M., El-Adawy M. and Robinson P. 2006.** Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology* 127:251-267.
- Salem A., Robinson P., El-Adawy M. and Hassan A. 2007.** *In vitro* fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science and Technology* 138:318-330.
- Salem H.B., Salem I.B. and Saïd M.B. 2005.** Effect of the level and frequency of PEG supply on intake, digestion, biochemical and clinical parameters by goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.)-based diets. *Small Ruminant Research* 56:127-137.
- Saminathan M., Sieo C.C., Abdullah N., Wong C.M.V.L. and Ho Y.W. 2015.** Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on *in vitro* methane production and rumen fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:2742-2749.
- Saminathan M., Sieo C.C., Gan H.M., Ravi S., Venkatachalam K., Abdullah N., Wong C.M. and Ho Y.W. 2016.** Modulatory effects of condensed tannin

- fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on the bovine rumen bacterial community *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:4565-4574.
- Saminathan M., Gan H.M., Abdullah N., Wong C., Ramiah S., Tan H., Siew C. and Ho Y. 2017.** Changes in rumen protozoal community by condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* 123:41-53.
- Santos-Buelga C. and Scalbert A. 2000.** Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1094-1117.
- Saro C., Ranilla M.J., Tejido M.L. and Carro M.D. 2014.** Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livestock Science* 160:52-59.
- Sayago A., Marín M.I., Aparicio R. and Morales M.T. 2007.** Vitamin E and vegetable oils. *Grasas y Aceites* 58:74-86.
- Scalbert A. 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875-3883.
- Scharenberg A., Arrigo Y., Gutzwiller A., Soliva C.R., Wyss U., Kreuzer M. and F. D. 2007a.** Palatability in sheep and *in vitro* nutritional value of dried and ensiled sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), and chicory (*Cichorium intybus*). *Archives of Animal Nutrition* 61:481-496.
- Scharenberg A., Arrigo Y., Gutzwiller A., Wyss U., Hess H.D., Kreuzer M. and Dohme F. 2007b.** Effect of feeding dehydrated and ensiled tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on nitrogen and mineral digestion and metabolism of lambs. *Archives of Animal Nutrition* 61:390-405.
- Scherf H., Machlin L., Frye T., Krautmann B. and Williams S. 1996.** Vitamin E biopotency: Comparison of various ‘natural-derived’ and chemically synthesized α -tocopherols. *Animal Feed Science and Technology* 59:115-126.
- Schofield P., Mbugua D. and Pell A. 2001.** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91:21-40.
- Schreurs N.M., Tavendale M.H., Lane G.A., Barry T.N., López-Villalobos N. and McNabb W.C. 2007.** Effect of different condensed tannin-containing forages, forage maturity and nitrogen fertiliser application on the formation of indole and skatole in *in vitro* rumen fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1076-1087.
- Schweigert F.J. 1998.** Metabolism of carotenoids in mammals. In *Carotenoids, Volume 3: Biosynthesis*: 249-284.
- Seigler D.S. 1991.** Cyanide and cyanogenic glycosides. *GS Rosenthal & MR Berenbaum*: 35-77.
- Serment A., Giger - Reverdin S., Schmidely P., Dhumez O., Broudiscou L.P. and Sauvant D. 2016.** *In vitro* fermentation of total mixed diets differing in concentrate proportion: relative effects of inocula and substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:160-168.
- Shabtay A., Eitam H., Tadmor Y., Orlov A., Meir A., Weinberg P., Weinberg Z.G., Chen Y., Brosh A., Izhaki I. and Kerem Z. 2008.** Nutritive and antioxidative

- potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:10063-10070.
- Shaw R.A., Villalba J.J. and Provenza F.D. 2006.** Resource availability and quality influence patterns of diet mixing by sheep. *Journal of Chemical Ecology* 32:1267-1278.
- Sheppard S.C., Cattani D.J., Ominski K.H., Biligetu B., Bittman S. and McGeough E.J. 2019.** Sainfoin production in western Canada: A review of agronomic potential and environmental benefits. *Grass and Forage Science* 74:6-18.
- Shingfield K.J., Salo-Väänänen P., Pahkala E., Toivonen V., Jaakkola S., Piironen V. and Huhtanen P. 2005.** Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows' milk. *Journal of Dairy Research* 72:349-361.
- Silanikove N., Perevolotsky A. and Provenza F.D. 2001.** Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91:69-81.
- Simonne A.H., Green N.R. and Bransby D.I. 1996.** Consumer acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *Journal of Food Science* 61:1254-1256+1280.
- Slots T., Skibsted L.H. and Nielsen J.H. 2007.** The difference in transfer of all-rac- α -tocopherol stereo-isomers to milk from cows and the effect on its oxidative stability. *International Dairy Journal* 17:737-745.
- Smith G.S. 1992.** Toxification and detoxification of plant compounds by ruminants: an overview. *Journal of Range Management* 45:25-30.
- Sommart K., Parker D., Rowlinson P. and Wanapat M. 2000.** Fermentation characteristics and microbial protein synthesis in an *in vitro* system using cassava, rice straw and dried ruzi grass as substrates. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 13:1084-1093.
- Speijers M.H., Fraser M.D., Theobald V.J. and Haresign W. 2004.** The effects of grazing forage legumes on the performance of finishing lambs. *The Journal of Agricultural Science* 142:483-493.
- Spencer C.M., Cai Y., Martin R., Gaffney S.H., Goulding P.N., Magnolato D., Lilley T.H. and Haslam E. 1988.** Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27:2397-2409.
- Stahl W., Schwarz W., Von Laar J. and Sies H. 1995.** All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. *Journal of Nutrition* 125:2128-2133.
- Stahl W., van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J., Faulks R.M., Gärtner C., Haenen G., Hollman P. and Holst B. 2002.** Bioavailability and metabolism. *Molecular aspects of medicine* 23:39.
- Stahl W. and Sies H. 2003.** Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine* 24:345-351.

- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales M. and de Haan C. 2006.** Livestock's long shadow: Environmental issues and options. *Renewable Resources Journal* 24:15-17.
- Steinfeld H. and Gerber P. 2010.** Livestock production and the global environment: Consume less or produce better? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18237-18238.
- Steinshamn H. 2010.** Effect of forage legumes on feed intake, milk production and milk quality—a review. *Animal Science Papers and Reports* 28:195-206.
- Sterndale S., Broomfield S., Currie A., Hancock S., Kearney G.A., Lei J., Liu S., Lockwood A., Scanlan V., Smith G. and Thompson A.N. 2018b.** Supplementation of Merino ewes with vitamin E plus selenium increases α -tocopherol and selenium concentrations in plasma of the lamb but does not improve their immune function. *animal* 12:998-1006.
- Stienezen M., Waghorn G.C. and Douglas G.B. 1996.** Digestibility and effects of condensed tannins on digestion of sulla (*Hedysarum coronarium*) when fed to sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 39:215-221.
- Strack D. 1997.** 10 - Phenolic Metabolism. In: PM Dey and JB Harborne, editors, Plant Biochemistry. Academic Press, London. p. 387-416.
- Strasburger E., Noll F., Schenk H. and Schimper A. 1994.** Tratado de Botánica. Edición actualizada por P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer & A. Bresinsky. 8ª edición castellana. Ed. Omega, SA Barcelona.
- Stringano E., Cramer R., Hayes W., Smith C., Gibson T. and Mueller-Harvey I. 2011.** Deciphering the complexity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) proanthocyanidins by MALDI-TOF mass spectrometry with a judicious choice of isotope patterns and matrixes. *Analytical chemistry* 83:4147-4153.
- Tantillo D.J. 2011.** Biosynthesis via carbocations: theoretical studies on terpene formation. *Natural product reports* 28:1035-1053.
- Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T. and Sivakumaran S. 2005.** Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology* 123-124 Part 1:403-419.
- Terrill T.H., Windham W., Evans J. and Hoveland C. 1990.** Condensed tannins in sericea lespedeza: Effect of preservation method on tannin concentration. *Crop Science* 30:219-224.
- Terrill T.H., Douglas G.B., Foote A., Purchas R., Wilson G. and Barry T.N. 1992a.** Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *The Journal of Agricultural Science* 119:265-273.
- Terrill T.H., Rowan A.M., Douglas G.B. and Barry T.N. 1992b.** Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58:321-329.

- Theodoridou K. 2010.** The effects of condensed tannins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on its digestion and nutritive value. Doctoral Thesis. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Pourrat J., Le Morvan A., Stringano E., Mueller-Harvey I. and Baumont R. 2010.** Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 160:23-38.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Le Morvan A., Picard F., Stringano E., Pourrat J., Mueller-Harvey I. and Baumont R. 2011a.** Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass and Forage Science* 66:402-414.
- Theodoridou K., Aufrère J., Niderkorn V., Andueza D., Le Morvan A., Picard F. and Baumont R. 2011b.** *In vitro* study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. *Animal Feed Science and Technology* 170:147-159.
- Theodoridou K., Aufrère J., Andueza D., Le Morvan A., Picard F., Pourrat J. and Baumont R. 2012.** Effects of condensed tannins in wrapped silage bales of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *animal* 6:245-253.
- Tibe O., Meagher L.P., Fraser K. and Harding D.R. 2011.** Condensed tannins and flavonoids from the forage legume sulla (*Hedysarum coronarium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:9402-9409.
- Tiemann T.T., Avila P., Ramírez G., Lascano C.E., Kreuzer M. and 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.
- Tikam K., Phatsara C., Sorachakula C., Vearasilp T., Samiprem S., Cherdthong A., Gerlach K. and Südekum K.H. 2015.** *In vitro* gas production, *in vivo* nutrient digestibilities, and metabolisable energy concentrations for sheep of fresh and conserved pangola grass. *Small Ruminant Research* 128:34-40.
- Toral P.G., Hervás G., Missaoui H., Andrés S., Giráldez F.J., Jellali S. and Frutos P. 2016.** Effects of a tannin-rich legume (*Onobrychis viciifolia*) on *in vitro* ruminal biohydrogenation and fermentation. *Spanish Journal of Agricultural Research* 14:1-9.
- Traber M.G. and Sies H. 1996.** Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Review of Nutrition* 16:321-347.
- Traber M.G. and Arai H. 1999.** Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annual Review of Nutrition* 19:343-355.
- Våge D.I. and Boman I.A. 2010.** A nonsense mutation in the beta-carotene oxygenase 2 (BCO2) gene is tightly associated with accumulation of carotenoids in adipose tissue in sheep (*Ovis aries*). *BMC Genetics* 11:10.
- Valares Masa C. 2011.** Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis doctoral, Universidad de Extremadura (España).

- Valdés B. 2000.** *Onobrychis* in Castroviejo, S. (coor.), Flora Ibérica Vol. VII: 955-970. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Valdivielso I., Bustamante M.Á., Buccioni A., Franci O., Ruiz de Gordo J.C., de Renobales M. and Barron L.J.R. 2015a.** Commercial sheep flocks – fatty acid and fat-soluble antioxidant composition of milk and cheese related to changes in feeding management throughout lactation. *Journal of Dairy Research* 82:334-343.
- Valdivielso I., Bustamante M.Á., de Gordo J.C.R., Nájera A.I., de Renobales M. and Barron L.J.R. 2015b.** Simultaneous analysis of carotenoids and tocopherols in botanical species using one step solid-liquid extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 173:709-717.
- Valenti B., Luciano G., Pauselli M., Mattioli S., Biondi L., Priolo A., Natalello A., Morbidini L. and Lanza M. 2018.** Dried tomato pomace supplementation to reduce lamb concentrate intake: Effects on growth performance and meat quality. *Meat science* 145:63-70.
- Valenti B., Natalello A., Vasta V., Campidonico L., Roscini V., Mattioli S., Pauselli M., Priolo A., Lanza M. and Luciano G. 2019.** Effect of different dietary tannin extracts on lamb growth performances and meat oxidative stability: comparison between mimosa, chestnut and tara. *animal* 13:435-443.
- Van Houtert M. 1993.** The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology* 43:189-225.
- Van Milgen J., Berger L.L. and Murphy M.R. 1993.** An integrated, dynamic model of feed hydration and digestion, and subsequent bacterial mass accumulation in the rumen. *British Journal of Nutrition* 70:471-483.
- Van Soest P.J., Robertson J.B. and Lewis B.A. 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science* 74:3583-3597.
- Van Soest P.J. 1994.** Nutritional ecology of the ruminant (2nd Edn.). *Cornell University Press. Ithaca, NY (USA)*.
- Vasta V. and Luciano G. 2011.** The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research* 101:150-159.
- Vernon R. 1986.** The growth and metabolism of adipocytes. In "Control and Manipulation of Animal Growth", eds. Buttery, PJ, Haynes, NB, and Lindsay, DB. London, Butterworths.
- Waghorn G.C., Shelton I. and Thomas V. 1989.** Particle breakdown and rumen digestion of fresh ryegrass (*Lolium perenne* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.) fed to cows during a restricted feeding period. *British journal of nutrition* 61:409-423.
- Waghorn G.C., Smith J. and Ulyatt M. 1990.** Effect of protein and energy intake on digestion and nitrogen metabolism in wethers and on ovulation in ewes. *Animal Science* 51:291-300.

- Waghorn G.C., Shelton I. and McNabb W. 1994.** Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. *The Journal of Agricultural Science* 123:99-107.
- Waghorn G.C. and Shelton I. 1995.** Effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the nutritive value of ryegrass (*Lolium perenne*) fed to sheep. *The Journal of Agricultural Science* 125:291-297.
- Waghorn G.C., Douglas G.B., Niezen J., McNabb W. and Foote A.G. 1998.** Forages with condensed tannins-their management and nutritive value for ruminants. In: Proceedings of the Conference-New Zealand Grassland Association. p 89-98.
- Waghorn G.C. and Clark D. 2006.** Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. In: International Congress Series. p 107-110.
- Waghorn G.C. 2008.** Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147:116-139.
- Waghorn G.C., Ulyatt M.J., John A. and 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. and Foote A.G. 1996.** Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *Journal of Agricultural Science* 126:353-362.
- Wang Y., McAllister T., Acharya S., Ominski K. and Krause D. 2008.** Tannin contents of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) grown with or without irrigation and harvested at different growth stages. In: Multifunctional grasslands in a changing world.(Organizing Committee of 2008 IGC/IRC Conference). p 667.
- Wang Y., Majak W. and McAllister T.A. 2012.** Frothy bloat in ruminants: cause, occurrence, and mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology* 172:103-114.
- Wang Y., McAllister T.A. and Acharya S. 2015.** Condensed tannins in sainfoin: composition, concentration, and effects on nutritive and feeding value of sainfoin Forage. *Crop Science* 55:13-22.
- Wegner G. and Foster E. 1963.** Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *Journal of Bacteriology* 85:53-61.
- Weiser H., Riss G. and Kormann A. 1992.** Selective biodiscrimination of α -tocopherol stereoisomers: similar enrichment of all 2R forms in rat tissues after oral all-rac- α -tocopheryl acetate. *Annals of the New York Academy of Sciences* 669:393-395.
- Weiss W. 1998.** Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. *Journal of Dairy Science* 81:2493-2501.
- Weston R. and Hogan J. 1968.** The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of ryegrass and forage oats. *Australian Journal of Agricultural Research* 19:419-432.
- Wilkinson J.M. and Toivonen M.I. 2003.** World silage: a survey of forage conservation around the world. Chalcombe Publ.

- Williams A., Audsley E. and Sandars D. 2006.** Determining the environmental burdens and resource use in the production of agricultural and horticultural commodities: Defra project report IS0205. Zu finden in: <http://randd.defra.gov.uk/Default.aspx>.
- Williams P., Ballet N. and Robert J. 1998.** A review of the provision of vitamins for ruminants. In: Proceedings preconference symposium of the Cornell nutrition conference. p 7-37.
- Wolfe R.M., Terrill T.H. and Muir J.P. 2008.** Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:1060-1067.
- Wolin M.J. 1960.** A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science* 43:1452-1459.
- Woodward S.L., Waghorn G.C., Lassey K.R. and Laboyrie P.G. 2002.** Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 62:227-230.
- Yagoubi Y., Joy M., Ripoll G., Mahouachi M., Bertolín J.R. and Atti N. 2018.** Rosemary distillation residues reduce lipid oxidation, increase alpha-tocopherol content and improve fatty acid profile of lamb meat. *Meat Science* 136:23-29.
- Yang A., Larsen T. and Tume R. 1992.** Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 43:1809-1817.
- Yang A. and Tume R.K. 1993.** A comparison of β -carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. *Biochemistry and Molecular Biology International* 30:209-217.
- Yang A., Brewster M.J., Lanari M.C. and Tume R.K. 2002.** Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat science* 60:35-40.
- Zavaleta de Lucio E. 2002.** Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Departamento de Nutrición y Bioquímica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México*: 223-236.
- Zawadzki F., Do Prado I. and Prache S. 2013.** Influence of level of barley supplementation on plasma carotenoid content and fat spectrophotometric characteristics in lambs fed a carotenoid-rich diet. *Meat science* 94:297-303.
- Zeller W.E., Ramsay A., Ropiak H.M., Fryganas C., Mueller-Harvey I., Brown R.H., Drake C. and Grabber J.H. 2015.** $1\text{H}-13\text{C}$ HSQC NMR spectroscopy for estimating procyanidin/prodelphinidin and *cis/trans*-flavan-3-ol ratios of condensed tannin samples: correlation with thiolytic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:1967-1973.
- Zicarelli F., Calabrò S., Cutrignelli M.I., Infascelli F., Tudisco R., Bovera F. and Piccolo V. 2011.** *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: Comparison of rumen and faecal inocula. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:1213-1221.

VIII. Anexos

Estancias realizadas



UNIVERSITÀ
degli STUDI
di CATANIA

Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente
Di3A

sezione di
produzioni animali

Catania, 15 de Diciembre de 2017.

A la atención de quien corresponda;

Certifico que Pablo José Rufino Moya, ha visitado mi laboratorio en la Universidad de Catania desde el 15 de Septiembre al 15 de Diciembre de 2017, participando de forma activa en tres proyectos diferentes y en el estudio de proteínas (electroforesis capilar) en muestras de leche y de ácidos grasos de cadena larga (cromatógrafo de gas) en hígado y líquido ruminal. Su trabajo se ha centrado en la extracción de los analitos para su análisis, manejo de los equipos de electroforesis capilar y cromatografía de gases, identificación y cuantificación de picos y análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Puedo constatar que P.J. Rufino Moya ha trabajado extremadamente bien, desarrollando gran cantidad de trabajo, demostrando una alta profesionalidad y capacidad de trabajo en equipo. Él será coautor de las publicaciones que se obtenga del trabajo realizado durante este periodo.

P.J. Rufino Moya será siempre bienvenido al trabajar en mi laboratorio y a colaborar en mis proyectos.

Prof. Alessandro Priolo



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Madrid, a 17 de octubre de 2016

A LA ATENCIÓN DE QUIEN CORRESPONDA

D. PABLO JOSÉ RUFINO MOYA ha realizado una estancia dentro de sus estudios de Doctorado bajo mi supervisión, a jornada completa entre el 5 de septiembre y el 14 de octubre de 2016. Durante este tiempo, Pablo ha llevado a cabo la extracción de metabolitos en músculos de cordero, seguida por el análisis por HPLC-ESI QTOF MS/MS de los mismos y su procesamiento mediante el programa Masshunter y diversas bases de datos (Phenol-Explorer, The Human Metabolome Database, etc.). Igualmente, ha analizado el perfil de polifenoles en forrajes empleando las mismas técnicas analíticas.

Pablo ha llevado a cabo estas tareas de una manera muy eficiente y sistemática, mostrando además una alta capacidad para el aprendizaje de nuevas técnicas. Así mismo, en todo momento ha tenido mucho interés por profundizar en los resultados obtenidos y su relación con otras medidas realizadas dentro de su Tesis Doctoral.

Por todo lo anterior, no tengo dudas de que Pablo, con sus conocimientos y aptitudes, podrá continuar una exitosa carrera en el campo de la investigación en alimentación y nutrición.

Dra. Jara Pérez Jiménez
Dpto. Metabolismo y Nutrición, ICTAN-CSIC,
Madrid, España

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA, 10
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/ JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 582 29 00
FAX: 91 584 48 53



© 2006
ICTAN: la gestión y operación del programa y desarrollo de investigación en el área de ciencia e tecnología de alimentos y nutrición.



Granada, 24 Octubre 2016

David R. Yáñez-Ruiz, Científico Titular del CSIC en la Estación Experimental del Zaidín (Granada), informa que Pablo José Rufino Moya visitó nuestro Instituto durante el periodo 28 del octubre al 6 de noviembre de 2015 para el aprendizaje y aplicación de las siguientes técnicas de laboratorio:

- Técnica para la determinación de la concentración de metano en producciones de gas in vitro en cromatógrafo de gases.
- Técnica de determinación de polifenoles totales en forrajes.

Durante su estancia Pablo se integró rápidamente con el equipo de trabajo y mostró una alta capacidad de aprendizaje de las técnicas antes referidas.

David R. Yáñez-Ruiz
Estacion Experimental del Zaidin (CSIC)
C/Camino del Jueves sn
18100, Armilla, Granada
Spain
david.yanez@ee.csic.es

david.yanez@ee.csic.es

C/PROFESOR ALBAREDA, 1
18008 GRANADA ESPAÑA
TEL: 958 18 16 00
FAX: 958 12 96 00

Participación en proyectos/convenios

Efecto de la inclusión del guisante como fuente proteica alternativa y del nivel energético de la dieta sobre la eficiencia en el cebo de rumiantes.

Código proyecto: RTA2014-00038-C02-01.
Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad
Entidades participantes: 5
Duración: 2016 - 2019.
Investigador responsable: M. Blanco Alibés
Número de investigadores participantes: 7

Efecto de compuestos fenólicos de la dieta sobre los parámetros productivos, reproductivos y de calidad de la canal y de la carne en la especie ovina.

Código proyecto: RTA2012-00080-00-00.
Entidad financiadora: Ministerios de Economía y Competitividad y Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
Entidades participantes: 3
Duración: 2013 - 2016.
Investigador responsable: M. Joy Torrens
Número de investigadores participantes: 8

Estudio de la disolución de hierro en rumen natural y en sangre de ovejas alimentadas con las diferentes cáusticas.

Tipo de contrato: Convenio
Empresa financiadora: Magnesitas Navarras S.A.
Entidades participantes: 1
Duración: 2015
Investigador responsable: M. Joy Torrens
Número de investigadores participantes: 4

Estudio del efecto de la aplicación de dos bioestimulantes y un biofertilizante a diferentes dosis y mezclas sobre el crecimiento, la producción y la calidad de la alfalfa.

Tipo de contrato: Convenio
Empresa financiadora: DAYMSA S.A.
Entidades participantes: 1
Duración: 2015
Investigador responsable: M. Joy Torrens
Número de investigadores participantes: 4

Producción científica

Publicaciones incluidas en el Journal Citation Reports (ISI)

- Natalello, A., Luciano, G., Morbidini, L., Valenti, B., Pauselli, M., Frutos, P., Biondi, L., **Rufino-Moya, P. J.**, Lanza, M., Priolo, A. 2019. Effect of feeding pomegranate byproduct on fatty acid composition of ruminal digesta, liver, and muscle in lambs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (16):4472-4482.
doi: 10.1021/acs.jafc.9b00307

- **Rufino-Moya, P. J.**, Blanco, M., Bertolín, J. R., Joy, M. 2019. Methane production of fresh sainfoin, with or without PEG, and fresh alfalfa at different stages of maturity is similar but the fermentation end products vary. *Animals* 9, (5) 197.
doi: 10.3390/ani9050197

- **Rufino-Moya, P. J.**, Blanco, M., Bertolín, J. R., Joy, M. 2019. Effect of the method of preservation on the chemical composition and in vitro fermentation characteristics in two legumes rich in condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 251, 12-20.
doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.02.005

- Bertolín, J., Joy, M., **Rufino-Moya, P. J.**, Lobón, S., Blanco, M. 2018. Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, retinol and cholesterol in ovine lyophilised samples of milk, meat, and liver and in unprocessed/raw samples of fat. *Food Chemistry* 257, 182-188.
doi.10.1016/j.foodchem.2018.02.139

Publicaciones no incluidas en el Journal Citation Reports (ISI)

- Lobón, S., Blanco, M., Sanz, A., **Rufino-Moya, P. J.**, Molino, F., Joy, M. 2015. Influencia del pastoreo de alfalfa o esparceta sobre los parámetros productivos y reproductivos de ovejas y corderos. *Pastos* 45 (1): 36-46.

Comunicaciones a Congresos Internacionales

- **10th International Symposium on the Nutrition of Herbivores.** INRA, Clermont-Ferrand (Francia). Septiembre, 2018.

Blanco, M., **Rufino-Moya, P. J.**, Lobón, S., Casasús, I., Joy, M. The inclusion of field pea in the fattening concentrate of lambs affected the degradability of the dry matter and volatile fatty acids. Tipo de comunicación: Póster.

- **63rd International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST).** Teagasc, Cork (Irlanda). Agosto, 2017.

Rufino-Moya, P. J., Blanco, M., Lobón, S., Joy, M., Pérez-Jiménez, J. Effect of grazing on sainfoin or alfalfa during lactation on lambs' muscle metabolites. A HPLC-ESI-QTOF MS Approach. Tipo de comunicación: Póster.

Rufino-Moya, P. J., Blanco, M., Joy, M. Antioxidant effects of dams' feeding system during lactation and the inclusion of quebracho in the fattening concentrate in lambs' tissues. Tipo de comunicación: Póster.

- **19th Meeting of the FAO-CIHEAM Mountain Pastures Network.** IAMZ, Zaragoza (España). Junio, 2016.

Rufino-Moya, P. J., Lobón, S., Blanco, M., Sanz, A., Joy, M. Effect of forage conservation and inclusion of condensed tannins on *in vitro* gas and methane production. Tipo de comunicación: Póster.

Comunicaciones a Congresos Nacionales

- **VI Workshop REMEDIA.** Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada (España). Abril, 2018.

Rufino-Moya, P. J., Bertolín, J. R., Blanco, M., Joy, M. Efectos del método de conservación sobre la composición química y los parámetros de la fermentación *in vitro* en la esparceta (*Onobrychis viciifolia*). Tipo de comunicación: Póster-Oral corta.

- **XVII Jornadas sobre la Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA).** IAMZ, Zaragoza (España). Mayo, 2017.

Rufino-Moya, P. J., Lobón, S., Blanco, M., Bertolín, J. R., Joy, M. Efecto del tipo de alimentación en ovejas en lactación sobre las vitaminas liposolubles en los tejidos del cordero lechal. Tipo de comunicación: Oral.

Rufino-Moya P.J., Lobón, S., Blanco, M., Bertolín, J. R., Joy, M. Efecto del sistema de alimentación de la oveja durante la lactación sobre los contenidos de vitaminas liposolubles en los tejidos del cordero categoría ternasco. Tipo de comunicación: Oral.

Blanco, M., **Rufino-Moya, P. J.**, Lobón, S., Casasús, I., Joy, M. La digestibilidad aparente de la materia orgánica y el nitrógeno según el nivel de inclusión de guisante en pienso para el cebo de corderos. Tipo de comunicación: Póster.