



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



CIHEAM

Trabajo Fin de Máster

Título:

INCLUSION DE DIFERENTES NIVELES DE ENSILADO DE HABA FORRAJERA EN RACIONES PARA VACUNO LECHERO: EFECTO SOBRE LA INGESTION VOLUNTARIA EN FUNCION DEL CONTENIDO EN COMPONENTES SECUNDARIOS

Autor:

Naouel Barhoumi

Director/es

Dra. Adela Martínez Fernández
Dr. Fernando Vicente Mainar

Facultad de Veterinaria

Año: 2016-2017

AGRADECIMIENTOS

Al terminal este trabajo, tengo que admitir que la realización de esta memoria fue el resultado de los esfuerzos de muchas personas a las que expreso mi agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría extender mi agradecimiento profundo a mis tutores Dra. Adela Martínez Fernández y Dr. Fernando Vicente Mainar por su orientación, paciencia, disponibilidad y especialmente sus consejos, sus correcciones y todo lo que he aprendido de ellos a la escala profesional.

Quiero agradecer a Isabel Feito y Lucia Rodríguez por sus ayudas, sus explicaciones, durante el periodo de análisis en el laboratorio.

Mis agradacimientos al Instituto Agronómica Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) por su contribución económica, académica y técnica.

Un agradecimiento al Dr. Armando Ocon: coordinador Área de Producción Animal del IAMZ, por sus orientaciones y su atenta de seguir este trabajo.

Mis preciosos y respetuosos agradecimientos a mis padres por su inestimable amor, su confianza, sus sacrificios y todos los sentimientos y valores que han inculcado en mí.

Mis agradecimientos sinceros a mis hermanos, su complicidad, su ternura, su apoyo, su presencia y su cariño eterno a pesar de la distancia que nos separa.

Deseo también agradecer mi amiga Loubna por el ambiente familiar que hemos tenido y por el esfuerzo que ha hecho para animarme y apoyarme en las buenas y las malas.

Muchas gracias al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) por permitir el desarrollo de este trabajo poniendo todos medios necesarios a mi disposición y a todos los componentes del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA.

Los trabajos que componen esta memoria han sido financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través de proyecto RTA2012-00065-C05-01, “Bases y estrategias de producción de cultivos forrajeros adaptados a las condiciones agroclimáticas de la Cornisa Cantábrica para la producción de leche de vacuno de calidad diferenciada en sistemas sostenibles, integrados en el territorio y orientados a los requerimientos de la nueva PAC”, cofinanciado con Fondos FEDER.

RESUMEN

En este trabajo, se ha evaluado la evolución del nivel de fenoles totales y taninos condensados en el haba forrajera desde el forraje fresco hasta su integración como ensilado en raciones completas mezcladas y estudiado el efecto del contenido de estos compuestos secundarios sobre la ingestión voluntaria de raciones de vacuno lechero y sobre la producción y composición de la leche.

Para ello, se tomaron muestras de los forrajes de Raigrás italiano en monocultivo (**RI**), del intercultivo Haba+Raigrás (**HR**) y del Haba forrajera en monocultivo (**HB**) en corte directo, prehenificadas 24 horas tras la cosecha, sus correspondientes ensilados tras un periodo de fermentación de 170 días y de las correspondientes raciones completas mezcladas (**TMR**) del ensayo de alimentación. Estas muestras se liofilizaron, se molieron en molino criogénico y fueron procesadas mediante una extracción sólido-líquido y los componentes secundarios separados en posteriores extracciones líquido-líquido. Se utilizó el ensayo de Folin-Ciocalteu, mediante el uso del ácido gálico como patrón, para determinar el contenido en fenoles totales de los forrajes (mg **EAG**/g MS) y el ensayo de Vainillina, que utilizó la (+)- catequina como patrón, para valorar el contenido en taninos condensados (μ g **EC**/g MS).

Los resultados obtenidos de fenoles totales y taninos condensados mostraron que el contenido en estos compuestos de la leguminosa en monocultivo (**HB**) y de su intercultivo con raigrás (**HR**) es superior ($P < 0,05$) al del raigrás italiano (**RI**). Estos compuestos disminuyen durante los procesos de prehenificado y ensilado. Posteriormente cuando se elaboraron las correspondientes raciones completas mezcladas, la concentración de fenoles totales y taninos condensados se diluyen aún más al integrar el resto de componentes de la ración hasta no mostrar diferencias entre dietas ($P > 0,05$) alcanzando en todos los casos concentraciones inferiores a las consideradas como limitantes para deprimir la ingestión.

Los resultados del análisis del valor nutritivo de los forrajes muestran que el contenido de proteína bruta del haba forrajera es superior al raigrás italiano tanto en el forraje verde como prehenificado y ensilado ($P < 0,05$). Sin embargo, para los rendimientos en energía metabolizable y materia orgánica digestible, el monocultivo del haba forrajera o

su intercultivo con el raigrás italiano no pueden competir con el raigrás italiano en monocultivo.

Con los ensilados de estos forrajes se elaboraron dietas mezcladas (TMR) con el fin de comparar el efecto de la inclusión de leguminosa sobre la ingestión voluntaria de las raciones del vacuno lechero. Se realizó un ensayo de alimentación en la finca del SERIDA de Villaviciosa, utilizando un diseño experimental en cuadrado latino 3x3, con tres dietas con diferente nivel de inclusión de ensilado de haba forrajera en tres periodos y en tres grupos de tres vacas cada uno. Se utilizaron nueve vacas frisonas en el segundo tercio de lactación en un manejo de producción semi-extensivo. El consumo de materia seca de cada una de las raciones completas mezcladas se determinó mediante un sistema computarizado de control de ingestión, mientras que la ingestión de pasto se estimó a partir de los requerimientos de energía de los animales en ensayo.

Los valores de ingestión de materia seca de raciones completas mezcladas no presentaron diferencias significativas entre las dietas (10,78 kg MS/d para el raigrás, 10,24 kg MS/d para el ensilado del intercultivo haba y raigrás y 10,29 kg MS/d para el ensilado de haba, $P>0,05$).

Se observaron diferencias significativas en la producción de leche entre dietas ($P<0,001$) en beneficio de las vacas alimentadas con raciones a base del ensilado de raigrás italiano en comparación con las alimentadas con el ensilado del haba forrajera, mientras que la presencia de la leguminosa en la ración mejoró significativamente la composición en grasa y proteína de la leche, aunque indujo un mayor contenido en urea.

SUMMARY

In this work, the evolution of the level of total phenols and condensed tannins in faba bean from the fresh forage until its integration as silage in total mixed rations was evaluated. The effect of the content of these secondary compounds on voluntary intake of dairy cow's rations and on production and composition of milk was studied too.

For this purpose, samples of the italian ryegrass forage (RI), the faba bean + ryegrass interculture (HR) and faba bean in monoculture (HB) were taken after harvest, after 24 hours of wilting, after a fermentation period of 170 days to silage and the corresponding total mixed rations (TMR) of the feeding trial. These samples were freeze-dried, ground in a cryogenic mill and processed by a solid-liquid extraction. Finally, the secondary components were separated in subsequent liquid-liquid extractions. It was used the Folin-Ciocalteu assay, using gallic acid as standard, to determine the content of total phenolic compounds of forage (mg EAG/g MS) and the Vanillin assay, which used (+) - catechin as standard, to determine the content of condensed tannins ($\mu\text{g EC/g MS}$).

The results of total phenols and condensed tannins showed that the content of these compounds of the legume in monoculture (HB) and its association with ryegrass (HR) was higher ($P < 0,05$) than that of italian ryegrass (IR). These compounds decrease during wilting and silage processes. Later, when the corresponding total mixed rations were made, the concentration of total phenols and condensed tannins were further diluted when the rest of the ration components were integrated until there was no difference among diets ($P > 0,05$), reaching in all cases concentrations lower than those considered as limiting for depressing intake.

The results of the analysis of the nutritive value of forages show that the crude protein content of the faba bean is higher than the italian ryegrass in both fresh, wilted and ensiled forages ($P < 0,05$). However, the metabolizable energy and digestible organic matter of faba bean in monoculture or associated with italian ryegrass can not compete with the italian ryegrass in monoculture.

With the silages of these forages, total mixed rations (TMR) were elaborated in order to compare the effect of legume inclusion on the voluntary intake by dairy cows. A feeding trial was carried out at the SERIDA farm in Villaviciosa, using a 3x3 latin

square experimental design, with three diets with different levels of inclusion of faba bean silage in three periods with three groups of three cows each. Nine Friesian cows in the second third of lactation, in a semi-extensive system production were used. The dry matter intake of each of the total mixed rations was determined by a computerized system of intake control, while grass intake was estimated from the energy requirements of animals in the feeding trial.

The values of dry matter intake of complete mixed rations showed not significant differences between the diets (10.78 kg MS/d for ryegrass, 10.24 kg DM/d for the association faba bean and ryegrass silage and 10.29 kg MS/d for faba bean silage, $P > 0,05$).

Significant differences in milk yield between diets ($P < 0,001$) were observed in favour of cows feeding rations based on italian ryegrass silage compared to those feeding faba bean silage, while the presence of legume in the ration improved significantly the proportion of fat and protein in milk, although it induced a higher urea content.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, il a été évalué l'évolution du niveau des composés phénoliques totaux et des tanins condensés dans la féverole dès le fourrage frais jusqu'à leur intégration comme ensilage dans les rations totalement mélangées et il a été étudié l'effet de la teneur de ces composés secondaires sur l'ingestion volontaire dans les rations de bovin laitier et sur la production et la composition du lait.

Pour cela, des échantillons des fourrages de ray-grass italien en monoculture (RI), de féverolle associée au ray-grass italien (HR) et la féverolle en monoculture (HB) ont été prélevés après la récolte, fanés 24 heures après la récolte, leurs ensilages après une période de fermentation de 170 jours et leurs rations totalement mélangées correspondantes (TMR) de l'essai d'alimentation. Ces échantillons ont été lyophilisés, broyés dans un broyeur cryogénique et ont été traités par une extraction solide-liquide et les composés secondaires ont été séparés par des ultérieurs extractions liquide-liquide. Il a été utilisé l'essai de Folin-Ciocalteu, à l'aide de l'acide gallique comme modèle standard, pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux des fourrages (mg EAG/g MS) et l'essai de la vanilline, qui a utilisé la (+) - catéchine en tant que modèle standard, pour évaluer la teneur en tanins condensés (mg CE/g MS).

Les résultats obtenus de polyphénols totaux et des tannins condensés ont montré que la teneur de ces composés dans la légumineuse en monoculture (HB) et de leur association avec le ray-grass (HR) est supérieure ($P < 0,05$) à celle de ray-grass italien (RI). Ces composés diminuent au cours des processus de fanage et d'ensilage. Par la suite lorsque les rations totalement mélangées correspondantes ont été élaborées, la concentration en composés phénoliques totaux et en tanins condensés est diluée suite à l'intégration du reste des composants de la ration jusqu'à montrer aucune différence entre les rations ($P > 0,05$) atteignant dans tous les cas des concentrations inférieures à celles considérées comme limitantes de la diminution de l'ingestion.

Les résultats de l'analyse de la valeur nutritive des fourrages montrent que la teneur en protéines brutes de féverolle est supérieure à celle de ray-grass italien vert, fané et ensilé ($P < 0,05$). Cependant, pour les rendements de l'énergie métabolisable et de matière

organique digestible, la féverole en monoculture ou associée avec le ray-grass italien ne peuvent pas rivaliser le ray-grass italien en monoculture.

Avec les ensilages de ces fourrages, des rations totalement mélangées ont été élaborées afin de comparer l'effet de l'inclusion de légumineuse sur l'ingestion volontaire des rations de vaches laitières. Il a été réalisé un essai d'alimentation, qui a été menée à la ferme de SERIDA de Villaviciosa en utilisant un modèle expérimental carré latin 3x3, avec trois rations avec différent niveau d'inclusion de l'ensilage de féverole durant trois périodes et dans trois groupes de trois vaches chacun. Il a été utilisé neuf vaches frisonnes dans le deuxième tiers de lactation et qui suivent un système de production semi-extensif. La consommation de matière sèche de chacune des rations totalement mélangées a été déterminée par un système informatisé de contrôle d'ingestion, tandis que l'ingestion de pâturage a été estimée à partir des exigences de l'énergie des animaux dans l'essai.

Les valeurs de l'ingestion de matière sèche de rations totalement mélangées ont montré aucune différence significative entre les rations (10,78 kg MS/j de ray-grass 10,24 kg MS/j pour l'ensilage de féverole associée au ray-grass et 10,29 kg MS/j pour l'ensilage de féverole, $P > 0,05$).

Ils ont été observés des différences significatives dans la production laitière entre les rations ($P < 0,001$) en faveur des vaches alimentées des rations à base d'ensilage de ray-grass italien par rapport à celles alimentées de l'ensilage de féverole, tandis que la présence de la légumineuse dans la ration a amélioré significativement la composition de graisse et de protéine du lait, bien qu'elle a induit une teneur en urée élevée.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Página
AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	III
SUMMARY	V
RÉSUMÉ	VII
ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XIV
ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Interés de la inclusión de las leguminosas forrajeras en las raciones de rumiantes	13
3.2. Inclusión de la haba forrajera (<i>Vicia faba L.</i>) en las dietas de vacas lecheras	16
3.2.1. Características agronómicas del haba forrajera	16
3.2.2. Valor nutritivo del haba forrajera en verde y conservada como ensilado	20
3.2.3. Contenido de moléculas bioactivas de las leguminosas	24
3.3. Compuestos secundarios (moléculas bioactivas)	26
3.3.1. Compuestos fenólicos (fenoles totales)	27
3.3.2. Taninos	28
3.3.2.1. Métodos analíticos de medida de taninos	31
3.4. Efectos de los taninos en la dieta del vacuno	33
3.4.1. Efecto sobre la ingestión y la digestión	33
3.4.2. Efecto sobre la producción y la calidad de leche	37
3.4.3. Efecto sobre el rendimiento y la calidad de carne	38
3.4.4. Efecto sobre la sanidad animal	38
3.4.5. Efecto sobre los residuos animales	40

Capítulo	Página
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1. Evolución de moléculas bioactivas en el forraje según su procesado	45
4.1.1. Material vegetal	45
4.1.2. Toma de muestras	46
4.1.3. Procesado de muestras	47
4.1.4. Extracción fenólica	49
4.1.5. Cuantificación del contenido en fenoles totales	50
4.1.6. Cuantificación del contenido en taninos condensados	51
4.1.7. Valoración del contenido en taninos hidrolizables	52
4.2. Ensayo de alimentación de vacuno lechero	53
4.2.1. Animales	53
4.2.2. Lugar experimental	53
4.2.3. Diseño experimental y alimentación	54
4.2.4. Determinaciones y controles	55
4.2.4.1. Control de ingestión	55
4.2.4.2. Control de producción de leche	59
4.2.4.3. Análisis de laboratorio	60
4.3. Análisis estadístico	61
5. RESULTADOS	65
5.1. Valor nutritivo de los forrajes según el estado de conservación	65
5.2. Valores de proteína bruta, materia orgánica digestible y energía de los diferentes forrajes utilizados en el ensayo	69
5.3. Contenido en fenoles totales de los forrajes y raciones completas mezcladas	73
5.4. Contenido en taninos condensados de los forrajes y de las raciones completas mezcladas	74
5.5. Efecto de componentes secundarios sobre la ingestión voluntaria	75
5.6. Efecto de componentes secundarios sobre las producciones	76
6. DISCUSIÓN	81
6.1. Valor nutritivo de los forrajes	81
6.2. Contenido en compuestos secundarios	82
6.3. Ingestión voluntaria de las vacas	83
6.4. Producción y composición de leche	84
7. CONCLUSIONES Y SÍNTESIS FINAL	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1.	Efectos de la presencia de algunas leguminosas en la dieta sobre diferentes aspectos relacionados con la alimentación de rumiantes	15
Tabla 2.	Valores medios de minerales y aminoácidos del haba	21
Tabla 3.	Los valores nutritivos de la haba forrajera para rumiantes	22
Tabla 4.	Valor nutritivo, digestibilidad, aporte energético y características de ensilabilidad de habas y de guisante forrajero en el momento de la cosecha	23
Tabla 5.	Producción de efluente, características nutritivas y fermentativas, digestibilidad y aporte energético estimado de los ensilados de habas y guisantes, ambos en monocultivo	24
Tabla 6.	Contenido en taninos condensados de algunas leguminosas según diferentes autores	25
Tabla 7.	Composición en compuestos secundarios (g/kg MS) del haba forrajera	26
Tabla 8.	Perfil de ácidos linoléicos y linolénicos (100g/100 ácidos grasos) del haba forrajera (monocultivo y en asociación) en comparación con el monocultivo de Raigrás italiano	38
Tabla 9.	Número de muestras consideradas para el análisis de moléculas bioactivas	46
Tabla 10.	Esquema de distribución de raciones unifeed a los tres grupos de animales durante los tres periodos de ensayo	54
Tabla 11.	Cantidades de ingredientes de las diferentes raciones (kg de MS /vaca /día)	55
Tabla 12.	Composición química de los forrajes verdes en el momento de la cosecha	65
Tabla 13.	Composición química de los forrajes prehenificados	66
Tabla 14.	Composición química de los ensilados de los forrajes	67
Tabla 15.	Composición química de las raciones completas mezcladas (TMR) según el ensilado de forraje incorporado en su elaboración	68
Tabla 16.	Contenido en proteína bruta (% MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas con raigrás italiano, haba forrajera e intercultivo de raigrás italiano y haba forrajera	70

Tabla	Título	Página
Tabla 17.	Contenido en materia orgánica digestible (% MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado y en el ensilado según tipo de forraje	71
Tabla 18.	Contenido en energía metabolizable (MJ/kgMS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas con raigrás italiano, haba forrajera e intercultivo de raigrás italiano y haba forrajera	72
Tabla 19.	Contenido en fenoles totales (mg EAG/g MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas elaboradas con los ensilados de los diferentes forrajes	73
Tabla 20.	Contenido en taninos condensados (mg EC/g MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas elaboradas con los ensilados de los diferentes forrajes	74
Tabla 21.	Peso vivo corporal, consumo total de materia seca y consumo de fenoles y taninos provenientes de la TMR de las vacas durante el ensayo de alimentación según tipo de ensilado de la ración	76
Tabla 22.	Producción y composición de la leche de las vacas del ensayo de alimentación según tipo de ensilado incluido en la ración	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Clasificación de taninos	29
Figura 2.	Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina y galocatequina) e hidrolizables (ácido gálico y ácido elágico)	29
Figura 3.	Relación entre la cantidad de huevos de nemátodos intestinales en heces (FEC; huevos/g; línea sólida) y la altura de pasto (cm; línea discontinua) en cabras de pastoreo cuyas dietas suplementadas o no con brezo (64 gTC/kgMS)	40
Figura 4.	Esquema del procesado, la extracción fenólica y el análisis de fenoles y taninos condensados	48

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía	Título	Página
Fotografía 1.	Monocultivo de haba forrajera en fase de desarrollo	17
Fotografía 2.	Detalle de las flores de una planta de habas forrajeras	17
Fotografía 3.	Detalle de la raíz de una planta de haba forrajera en la que se aprecian los nodulos de <i>Rhizobium</i>	17
Fotografía 4.	Envergadura del cultivo de habas forrajeras en el momento de la cosecha	18
Fotografía 5.	Esquema de localización de los cultivos forrajeros objeto del estudio en la finca experimental del SERIDA en Villaviciosa	45
Fotografía 6.	Pasos de la extracción fenólica	49
Fotografía 7.	Fraccionamiento orgánico con dietil éter y con acetato de etilo	50
Fotografía 8.	Vacas alojadas en zona de control de alimentación	53

ABREVIATURAS

AFRC: Agricultural and Food Research Council

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

AGS: Ácidos grasos saturados

AGV: Ácidos grasos volátiles

ALM: Almidón

AzSol: Azúcares solubles

CEN: Cenizas

CH₄: Metano

CLA: Ácido linoléico conjugado

CT: Capacidad tampón

De: Digestibilidad enzimática de la materia orgánica

d.e.r.: Desviación estándar residual

Do: Digestibilidad in vivo de la materia orgánica

EAG: Ácido gálico

EC: Catequina

EE: Extracto etéreo

EM: Energía metabolizable

EM_{ADAS}: Energía metabolizable determinada según el ADAS

EM_{MAFF}: Energía metabolizable determinada según el MAFF

EN: Energía neta

EN_d: Requerimientos de EN para el desplazamiento

EN_g: Requerimientos de EN para gestación

EN_L: Energía neta para lactación

EN_m: Requerimientos de EN para el mantenimiento

EN_p: Requerimientos de EN para el pastoreo

EN_{pv}: Requerimientos de EN para el cambio de peso vivo

ESM: Extracto seco magro

FAD: Fibra ácido detergente

FB: Fibra bruta

FND: Fibra neutro detergente

HB: Haba forrajera

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HR: Haba+Raigrás

LC-MS: Cromatografía líquida de Espectrometría de Masas

LCE: leche corregida por energía

LCG: leche corragida por grasa

MELN: Materiales extractivos libres de nitrógeno

MOD: Materia orgánica digestible

MS: Materia seca

MSI: Materia seca ingerida

N: Nitrógeno

NRC: National Research Council

P: Significación estándar

PB: proteína bruta

PDIA: Proteínas digestibles en el intestino permitido por el alimento

PDIE: Proteínas digestibles en el intestino permitido por la energía del alimento

PDIN: Proteínas digestibles en el intestino permitido por la proteína del alimento

PTN: Peso de ternero al nacimiento en kg

PV: Peso vivo

PV_i: Peso vivo inicial

PV_f: Peso vivo final

SERIDA: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario

RI: Raigrás italiano

TC: Taninos condensados

TMR: Ración completa mezclada (Total mixed ration)

UFL: Unidad forrajera de leche

UFV: Unidad forrajera de carne

Var PV: Variación de peso vivo

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

En la actualidad, cuando hablamos de nutrición animal, no hay que considerar únicamente la repercusión de la alimentación sobre el rendimiento productivo de los animales, sino que hay que tener en cuenta otros factores como el coste de producción, la calidad del producto final, la sanidad animal y el medio ambiente. Por ello, encontrar cultivos destinados a la alimentación animal que puedan satisfacer estos requisitos se convierte en un desafío para los ganaderos.

En los últimos años, con el fin de superar varios problemas que amenazan la biodiversidad, la Política Agraria Común de la Unión Europea para el periodo 2015-2020 (Real Decreto 1075/2014), está animando a la agricultura a revalorizar los pastos y los cultivos forrajeros mediante ayudas directas procedentes del llamado pago verde o greening. Esto implica realizar prácticas agrícolas beneficiosas para el clima y el medio ambiente, como la diversificación de cultivos, el mantenimiento de los pastos permanentes existentes y contar con superficies de interés ecológico. Para ello, es necesario incorporar en las tierras de cultivo nuevas especies y variedades, como por ejemplo cultivos fijadores de nitrógeno, que garanticen la sostenibilidad del medio ambiente aumentando sustancialmente la producción de proteínas vegetales (Otero y López, 2015) e investigar sobre estos cultivos para encontrar un manejo adecuado en condiciones edafológicas bien definidas y mejorar el rendimiento del animal reduciendo los gastos de explotación.

La mejora de la rentabilidad del sector lechero requiere un cambio en los sistemas de alimentación hacia la utilización de los recursos forrajeros propios (Baizán et al., 2015). En este sentido, el desafío de las explotaciones lecheras de la Cornisa Cantábrica se orienta a modificar el manejo tradicional de la rotación raigrás italiano-maíz forrajero, introduciendo nuevas especies y variedades que puedan ser alternativas viables al raigrás italiano como cultivo invernal de la rotación, ya que la sustitución del maíz como segundo cultivo de la rotación es difícil a causa de su elevada producción y contenido en energía en un periodo de cultivo relativamente corto en condiciones de secado húmedo (Resch et al., 2013).

La incorporación de leguminosas fijadoras de nitrógeno (haba forrajera, guisante forrajero, altramuza, alfalfa, esparceta, etc.) que hasta el momento no son habituales en la Cornisa Cantábrica, pueden resultar alternativas de cultivo muy interesantes. Diversos

trabajos de investigación han puesto de manifiesto que las leguminosas forrajeras tienen muchos beneficios sobre la gestión económica de la explotación, ya que representan una fuente barata de proteínas (Borreani et al., 2009), permiten mejorar la producción de leche y la salud humana mediante una mejora de la calidad de leche, al reducir los ácidos grasos (AG) saturados y aumentar los poliinsaturados (en particular de $\Omega 3$) y, por lo tanto, reduciendo la proporción $\Omega 6/\Omega 3$ (Dewhurst et al., 2006). Además, permiten reducir los residuos animales ya que aumentan la excreción del nitrógeno fecal en comparación del nitrógeno urinario (Copani et al., 2016).

Otra característica de las leguminosas forrajeras y especialmente del cultivo en cuestión en este trabajo, el haba forrajera, es su contenido en moléculas bioactivas. Dentro de este grupo de componentes secundarios, los más habituales son los taninos condensados, compuestos polifenólicos presentes en las plantas que desempeñan un papel de defensa contra herbívoros y patógenos. Se consideran generalmente como factores antinutricionales, aunque también pueden tener efectos beneficiosos en la alimentación de los rumiantes. Estas moléculas pueden actuar sobre el rendimiento del animal y la calidad de los productos, inhibiendo la biohidrogenación ruminal, modificando el metabolismo de las proteínas y de los lípidos en el tracto digestivo (Martín-Pedrosa et al., 2016) y pueden aumentar la eficiencia de la conversión de proteínas en los rumiantes. Además, pueden afectar positivamente a la sanidad de los rumiantes como alternativas antiparasitarias (Baumont et al., 2016; Lombardi et al., 2015). También es conocido que actúan reduciendo el impacto negativo de residuos animales (nitrógeno y metano) en el medio ambiente (Baumont et al., 2016). Ahora bien, una concentración elevada de taninos condensados en la dieta disminuye su consumo debido a un efecto astringente en la saliva, que reduce la aceptación de estos compuestos por el animal y en consecuencia disminuyen la ingestión voluntaria (Aerts et al., 1999). Aufrere et al. (2013) indican que una concentración de taninos condensados entre 50-60 g/kg MS no afecta negativamente ni a la ingestión ni a la digestión. Ahora bien, Aerts et al. (1999) demostraron que una cantidad comprendida entre 60-120 g/kg MS reduce la ingestión voluntaria, la eficiencia digestiva y la productividad del animal.

El haba forrajera (*Vicia faba* L.) es una leguminosa fijadora del nitrógeno que mejora la composición del suelo y es un cultivo anual muy adecuado para la rotación corta de cultivos cuando se usa como ensilado (Borreani et al., 2009). Tanto en monocultivo

como asociada con raigrás italiano, representa una buena alternativa al monocultivo de raigrás italiano como cultivo de invierno para rotar con maíz, ya que mejora la producción en proteína y energía, afectando positivamente la calidad de leche y reduciendo los costes de producción (Baizán et al., 2015). El haba forrajera, contiene taninos que hacen complejos con las proteínas en la dieta. Esta asociación reduce la degradabilidad de la proteína dietética en el rumen y reduce la excreción urinaria de nitrógeno, aumentando la fecal, lo que conlleva un menor efecto negativo para el ambiente, aumentando la eficacia alimentaria (Min et al., 2003). También su unión con enzimas cambia el contenido de la microbiota ruminal, especialmente el contenido en protozoos responsables de la metanogénesis, disminuyendo consecuentemente la producción de metano (Fraser et al., 2001).

Por todo lo anteriormente expuesto, con el fin de mejorar la gestión de producción forrajera para alcanzar la sostenibilidad económica y ambiental de las explotaciones de leche en la Cornisa Cantábrica se están investigando nuevos cultivos forrajeros de invierno como alternativas viables al raigrás italiano para rotar con el maíz el forrajero. Estos cultivos serán integrados en sistemas de alimentación adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la región con el propósito de obtener una buena calidad de leche de vacuno que cumpla todos los requisitos nutricionales actuales.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Para avanzar en este propósito, el objetivo general de este trabajo ha sido:

Evaluar la influencia de la inclusión de ensilado de haba forrajera en raciones completas mezcladas o unifeed sobre la ingestión voluntaria en vacas lecheras en función del contenido en compuestos secundarios.

La estrategia experimental a seguir para lograr este objetivo fue dividida en dos ensayos:

1. Ensayo *in vitro* analítico de moléculas bioactivas: Procesado, extracción, valoración y cuantificación del contenido de fenoles totales y taninos condensados presentes en los forrajes objeto de estudio en diferentes etapas desde la cosecha hasta su incorporación en la ración: forrajes verdes, prehenificados, ensilados e incorporados a las mezclas completas.
2. Ensayo *in vivo* de alimentación de vacuno lechero:
 - Comparación de la ingestión de vacas en producción alimentadas con tres dietas diferentes en función del porcentaje de inclusión de ensilado de haba forrajera.
 - Efecto de la proporción de ensilado de haba forrajera en la ración sobre la producción y composición de leche de vaca.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. Revisión bibliográfica

3.1. Interés de la inclusión de las leguminosas forrajeras en las raciones de rumiantes

Los sistemas de alimentación basados principalmente en la utilización de forrajes son económicamente más competitivos, con un mayor rendimiento de los rumiantes, en comparación a los basados en alimentos concentrados (Girard et al., 2016).

Hoy en día, las leguminosas forrajeras tienen un gran interés agronómico y ganadero, con gran importancia en las raciones para rumiantes y especialmente para vacuno de leche. Son capaces de fijar simbióticamente hasta 463 kg de N atmosférico por hectárea y año. Debido a sus elevados niveles de ingestión (10 a 15 % más que las gramíneas) y de nitrógeno, permiten mejorar el rendimiento animal, reduciendo la compra de alimentos concentrados (Baumont et al., 2016). Son ricas en proteína, pero tienen bajo contenido en carbohidratos y en fibra neutro detergente, y presentan un valor energético equivalente o ligeramente inferior a las gramíneas (Baumont et al., 2007). Borreani et al. (2009) mencionaron que los ensilados de cultivos anuales de leguminosas forrajeras mejoran los sistemas de producción, ya que representan una fuente barata de proteína y almidón. Su alto contenido de sustancias nitrogenadas, se utiliza para corregir el desequilibrio entre PDIN y PDIE, o para cubrir la baja densidad de energía en las raciones (Baumont et al., 2016). Sus ensilados son una buena combinación con el de maíz, consiguiendo un equilibrio en proteína y energía y reduciendo el coste de alimentación (Peyraud et al., 2015). Baumont et al. (2016) añadieron que el rendimiento de animales alimentados con raciones a base de concentrado y ensilado de maíz es equivalente al obtenido con dietas a base de leguminosas forrajeras, lo que mejora el aspecto económico. Sin embargo, otros estudios mostraron que estos cultivos pueden tener efectos negativos sobre la ingestión según sus niveles de inclusión en la dieta porque pueden modificar el metabolismo de las proteínas y los lípidos en el tracto digestivo (MacAdam y Villalba, 2015; Martín Pedrosa et al., 2016).

La incorporación de ensilados de leguminosas forrajeras en la dieta de rumiantes puede inferir propiedades saludables al producto, ya que, contienen 10-30 g/kg MS de AG totales incluyendo 35 a 70 % de ácido linoleico (C18:3) (Dewhurst et al., 2006). Su inclusión en la ración modifica positivamente la calidad de leche y de la carne influyendo sobre su perfil en ácidos grasos mediante la reducción de los ácidos grasos

saturados (AGS) y aumentando los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI; Ω 3), y por lo tanto su consumo mejora la salud humana (Molares-Almaráz et al., 2010; He et al., 2012). Este efecto sobre la insaturación de la grasa puede ser especialmente conseguido con una administración de suplementos de esparceta para la producción de leche inhibiendo la biohidrogenación ruminal (Toral et al., 2016) y carne (Girard et al., 2016). Baumont et al. (2016) afirmaron que el uso del trébol rojo en las dietas de vacuno de engorde (raza Limousin) aumenta el Ω 3 en la carne un 83% en comparación con la alfalfa que aumenta solamente el Ω 3 un 16%.

Las leguminosas forrajeras también pueden ser utilizadas como alternativas antiparasitarias para rumiantes (Lombardi et al., 2015). Además, las leguminosas forrajeras tienen un efecto sobre el medio ambiente, reduciendo el impacto negativo de los residuos animales: menores residuos de N debido a su fijación biológica de nitrógeno en el suelo (Baumont et al., 2016; Copani et al., 2016; Hatew et al., 2015).

Por otra parte, las leguminosas también tienen fitoestrógenos como compuestos secundarios que afectan negativamente a la reproducción de rumiantes, reduciendo el rendimiento reproductivo de las vacas y las ovejas ya que causan cambios genitales, trastornos ováricos y abortos. Estos compuestos pueden ser secretados en la leche en forma equol (isoflavandiolo metabolizado a partir de la daidzeína por la flora intestinal bacteriana) que juega un papel importante en la salud humana, sobre todo en las mujeres que consumen esta leche, ya que reduce los síntomas asociados con la menopausia y previenen la osteoporosis (Adler et al., 2014).

En los últimos años ha habido un interés creciente en las zonas productoras de leche de la Cornisa Cantábrica por incluir leguminosas en las rotaciones, destacando algunos trabajos en Navarra, País Vasco, Asturias y Galicia que incluyeron cereales como avena, centeno y triticale asociados con leguminosas como veza común, haba y guisante (Piñeiro et al., 2004; Suárez et al., 2004) y que apuntan al buen comportamiento productivo de algunas de ellas.

Basado en una revisión de Baumont et al. (2016), en la tabla 1 se muestran los efectos de la inclusión de diferentes leguminosas en la dieta de rumiantes sobre algunos aspectos relacionados con la alimentación, como por ejemplo el valor alimenticio de la ración, la calidad de la conservación del ensilado, el rendimiento animal y la calidad de los productos, la sanidad animal y las emisiones de gases de efecto invernadero.

Tabla 1. Efectos de la presencia de algunas leguminosas en la dieta sobre diferentes aspectos relacionados con la alimentación de rumiantes

		Alfalfa <i>(Medicago sativa)</i>	Trébol rojo <i>(Trifolium pratense)</i>	Esparceta <i>(Onobrychis vicifolia)</i>	Trébol blanco <i>(Trifolium repens)</i>
Valor alimentario	Energía	= 0 -	= 0 -	= 0 -	+
	Ingestión	+	+	+	++
	Valor de nitrógeno	+	+	+	+
		(exceso PDIN)	(exceso PDIN)		(exceso PDIN)
Calidad de conservación	Heno	= 0 -	= 0 -	= 0 -	NR
	Ensilado	= 0 -	= 0 +	= 0 +	NR
Rendimientos del animal	Producción de leche	=	=	= 0 -	++
	crecimiento / engorde	=	=	= 0 -	++
Sanidad	Riesgo de meteorismo	Sí	Sí	No	Sí
	Parasitismo	=	=	+	=
	Reproducción	?	?	NR	?
Calidad de productos	Perfil de AG	= 0 +	= 0 ++	= 0 +	= 0 +
	Calidad de la canal	=	=	NR	NR
	Calidad sensorial de carne	= 0 - (corderos)	=	NR	= 0 - (corderos)
Emisiones	Nitrógeno	-	= 0 -	= 0 +	-
	Metano	= 0 +	= 0 +	= 0 +	= 0 +

(Fuente: Baumont et al., 2016).

(++, +, = y - indican, respectivamente, respuestas muy positivas, positivas, neutras o negativas o en comparación con los cereales forrajeros o hierba; NR = no especificada; ?= no se sabe)

3.2. Inclusión del haba forrajera (*Vicia faba* L.) en las dietas de vacas lecheras

3.2.1. Características agronómicas del haba forrajera

Según Muehlbauer y Tullu (1997), el haba forrajera de la especie *Vicia faba* L. es una leguminosa forrajera anual de porte erecto con uno o más tallos huecos, que puede crecer hasta una altura de 1,5-2 m, con flores grandes, de color blanco con manchas de color púrpura oscuro. Un grupo de flores puede producir hasta cuatro vainas verdes y grandes (de 18 a 20 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho) que se vuelven oscuras, de marrón a negro, en la madurez. Cada vaina contiene de tres a cuatro semillas (Louw, 2009).

Posee una fuerte raíz principal pivotante y muchas raíces laterales fibrosas que exploran hasta una profundidad de 90 cm desde la superficie del suelo, que le permite aprovechar los minerales del suelo y que puede enriquecer el suelo en humus y en nutrientes mejorando su capacidad de intercambio catiónico gracias a su sistema radicular que bombea nutrientes y agua hacia la superficie de manera eficaz.

En las fotografías 1 a 4, se muestran diferentes detalles de la planta del haba forrajera.

El haba forrajera se cultiva en suelos oscuros de textura ligera y responde muy bien al riego (McVicar et al., 2013). Se siembra a mediados o finales de otoño y crece lentamente durante principios del invierno (Matthews y Marcellos, 2003). Según estos autores, se puede aplicar fosfato con la semilla en el momento de la siembra, a tasas de 15-20 kg/ha de fosfato. La fertilización con zinc a la siembra se recomienda con un mínimo de 5 kg/ha en los suelos arcillosos, también es recomendable aplicar 150 g/ha de molibdato de sodio si no se aplicó el molibdeno previamente en la rotación.

Durante el desarrollo del cultivo requiere una atención especial, ya que es sensible a muchas plagas y enfermedades, como la pudrición de la raíz, nematodos de tallo y también a la presencia de malas hierbas (Muehlbauer y Tullu, 1997).

Si hay precipitaciones razonables, el cultivo puede no necesitar riego hasta principios de la primavera. Hay que comprobar los niveles de humedad del suelo a partir de principios de agosto (previo a la siembra en otoño) y aplicar el primer riego tan pronto como sea necesario (Matthews and Marcellos, 2003).



Fotografía 1. Monocultivo de haba forrajera en fase de desarrollo (Foto SERIDA)



Fotografía 2. Detalle de las flores de una planta de haba forrajera



Fotografía 3. Detalle de la raíz de una planta de haba forrajera en la que se aprecian los nodulos de *Rhizobium*



Fotografía 4. Envergadura del cultivo de habas forrajeras en el momento de la cosecha

El haba forrajera es una leguminosa muy productiva (5-8 t MS de forraje/ha/año). No requiere fertilización nitrogenada, ya que fija el N simbióticamente gracias a su asociación con las bacterias del género *Rhizobium* presentes en el suelo (Fotografía 3). Fija de 150 a 320 kg de nitrógeno/año que, posteriormente, libera durante su crecimiento. Actúa ayudando a tomar elementos minerales del suelo, mejora las propiedades físicas del mismo, enriqueciéndolo en humus y en nutrientes y mejorando su capacidad de intercambio catiónico (Mijangos et al., 2015). En trabajos, realizados en el SERIDA, Martínez-Fernández et al. (2005) y Baizán et al. (2015), observaron rendimientos similares en la producción de forraje entre el corte único de haba forrajera en monocultivo y la producción acumulada de dos cortes de raigrás italiano.

Se considera una leguminosa adecuada para rotar con cereales del invierno (McVicar et al., 2013), debido a su capacidad para fijar nitrógeno de manera biológica (que afecta positivamente el valor nutritivo de cultivos), al aumento de la masa radicular en el suelo

influenciado por los nutrientes del suelo, y a su capacidad de reducir las malas hierbas y enfermedades en el siguiente cultivo (Louw, 2009).

Según Matthews y Marcellos (2003), en una rotación con trigo en Australia, esta leguminosa aportó 270 kg de N/ha al suelo, lo que aumentó el rendimiento de la cosecha del trigo entre 1,0 y 1,5 t/ha con un incremento del contenido en proteína entre 0,7 y 1%.

También es viable en cultivo mixto con cereales, ya que la asociación de habas con un cereal tiene un efecto positivo en la calidad nutritiva global de los cultivos. En estas asociaciones los cereales aportan materia seca y azúcares solubles, mejorando el coeficiente de fermentabilidad con vistas a la conservación mediante ensilado del forraje cosechado, mientras que la leguminosa aporte nitrógeno a la mezcla. Los principales beneficios de estas asociaciones radican en una mayor productividad del conjunto de la rotación de cultivos como consecuencia del incremento de fertilidad del suelo a largo plazo y del aumento de la biodiversidad (de la Roza et al., 2004; Martínez-Fernández et al., 2005; 2010; 2013b; 2014).

Según Métivier (2014), el contenido de proteína de la asociación de haba con un cereal es superior a las mezclas de cereales con guisantes. Cuando se cultiva asociada con maíz, éste presenta una longitud de la raíz, una biomasa aérea y un contenido de fósforo mayores, ya que las habas tienen una mayor exudación de citrato y fosfatasa ácida, lo que sugiere una mayor capacidad para movilizar el fósforo en la rizosfera y facilitan la disponibilidad de este elemento en el suelo beneficiando el crecimiento del maíz en la mezcla de grano de maíz/haba (Zhang et al., 2016).

Otra alternativa es su cultivo en asociación con abonos verdes, que se caracterizan por poseer la función de recuperación y reequilibrio mineral en los cultivos, así como por promover una mayor eficiencia en el reciclaje de nutrientes mediante su movilización y solubilización. Su introducción puede ser efectiva para desinfectar los suelos, controlar insectos, hongos, nematodos y especies arvenses, mantener la fertilidad del suelo y prevenir la erosión (Baizán et al., 2015). En este sentido, Martínez Fernández et al. (2013) compararon los rendimientos productivos de un cultivo asociado de habas y colza con los dos aprovechamientos sucesivos en primavera de raigrás italiano, obteniendo 9,82 vs. 7,88 t MS/ha para las habas asociadas con colza y el raigrás italiano en monocultivo respectivamente.

Cuando el cultivo está destinado a semilla seca, se cosecha completamente maduro. En este caso el sistema de recolección puede ser tirar y trillar la cosecha a mano o de modo mecanizado. Los granos pueden estar maduros entre 90-220 días después de la siembra dependiendo de la localización (Muehlbauer, 1997). El control de gorgojos es necesario para obtener un buen almacenamiento (UNIP, 2014).

Cuándo se consume como forraje, se cosecha en verde en primavera. Una vez cosechada, y en el momento de realizar los ensilados, hay que poner mucha atención a su manejo, la temperatura del silo debe ser monitorizada cuidadosamente ya que la semilla puede llegar a 35 °C, lo que puede conllevar crecimiento de hongos y problemas en la fermentación.

3.2.2. Valor nutritivo del haba forrajera en verde y conservada como ensilado

El haba forrajera que se utiliza principalmente para la alimentación del ganado produce semillas pequeñas, del orden de 250-350 g/1000 semillas, y constituye un ensilado de buena calidad (McVicar et al., 2013). Además de los ensilados de la planta entera, las semillas del haba forrajera son una buena fuente de alimentación para el ganado (Feedipedia, 2016). Es recomendada en las raciones como una fuente protéica alternativa a la soja en Europa (Smith et al., 2013) pudiendo sustituir al heno de avena en dietas de las vacas lecheras en lactación (Louw, 2009).

de la Roza et al. (2004) destacaron sus grandes nódulos de *Rizhobium*, porte erguido, aporte de proteína y alta digestibilidad. Como forraje verde tiene una calidad relativamente buena, con un contenido de proteína (PB) que oscila desde 14% a más del 20% sobre materia seca (MS). El mayor contenido de proteína se produce en la etapa de floración plena y disminuye después. Su paja tiene un contenido de proteína mucho más bajo, de 5% hasta 11% sobre MS, con altas concentraciones de lignina y cenizas (Alibes et al., 1990). A diferencia de la mayoría de las leguminosas, su baja capacidad tampón y alto contenido en azúcares solubles les confiere una ensilabilidad aceptable (de la Roza et al., 2004; Martínez-Fernández et al., 2010). Baizán et al. (2015) también corroboraron estos resultados, destacando que, en comparación con el raigrás italiano cabe destacar su aporte protéico, con rendimientos en proteína por ha para las habas forrajeras en monocultivo o en asociación con raigrás italiano de 890 y 1011 kg PB/ha kg

respectivamente, claramente superiores a los 703 kg PB/ha obtenidos con los dos cortes acumulados de raigrás italiano en monocultivo. Esto puede suponer una mejora en la eficiencia de los sistemas de producción en las explotaciones lecheras, al reducir la necesidad de concentrados y supone un descenso en los costes de producción derivado de la mayor cantidad y calidad del forraje al incrementar significativamente el contenido protéico de la dieta forrajera (Martínez-Fernández et al., 2016).

Tienen un contenido adecuado de fósforo, pero es bajo en calcio, manganeso y hierro (Tabla 2). Cuando se comparan con cereales, su contenido de lisina es mayor y el contenido de los aminoácidos que contienen azufre, cisteína y metionina, son bajos (Crepón et al., 2010).

Tabla 2. Valores medios de minerales y aminoácidos del haba

Minerales	Unidad	Media
Calcio	g/kg MS	1,5
Fósforo	g/kg MS	5,5
Potasio	g/kg MS	11,5
Sodio	g/kg MS	0,1
Magnesio	g/kg MS	1,8
Manganeso	mg/kg MS	10
Zinc	mg/kg MS	34
Cobre	mg/kg MS	13
Hierro	mg/kg MS	75
Aminoácidos		
Cistina	g/kg protein	12
Lisina	g/kg protein	62
Metionina	g/kg protein	8

(Fuente: Feedipedia, 2016).

Según (Louw, 2009), la proporción de fibra neutro detergente (FND) se incrementa con el aumento de la edad de la planta, mientras que la proporción de fibra ácido detergente (FAD) se mantiene constante o disminuye ligeramente con el aumento de madurez de la

planta. Su valor energético es equivalente a los granos de cereales, especialmente a la cebada, lo que confirma su eficacia como fuente de energía (Sauvant et al., 2004).

McKnight y MacLeod, (1977) afirman que, en vacas Holstein lactantes alimentadas con ensilado de haba o ensilado de gramíneas, la digestibilidad aparente de la materia seca, proteína y energía, y las proporciones de ácidos grasos volátiles del rumen son similares. Brunschwig y Lamy (2003) reportaron que una suplementación de haba en la dieta de vacuno lechero permite un incremento en la ingestión de materia seca de 1,2 kg /día.

En la tabla 3 se muestran los valores de digestibilidad, energía y degradabilidad del haba forrajera destinada a la alimentación de rumiantes.

Tabla 3. Valor nutritivo del haba forrajera para rumiantes

	Media	Intervalo	DE	N
Digestibilidad de MO (%)	91,1*	87,2 – 96,3	2,6	14
Digestibilidad de la energía (%)	89,8*	83,0 – 92,9	3,0	14
Energía metabolizable (MJ/kg MS)	13,3*	12,5 – 14,5	0,6	12
Digestibilidad del N (%)	78,9			
Fracción soluble a (%)	53,8	30,0 – 79,0	21,5	5
Fracción lentamente degradable b (%)	38,4	14,1 – 70,0	25,8	5
Tasa de degradación c (h⁻¹)	0,092	0,70 – 0,110	0,015	5
Degradabilidad del N (K= 4; %)	80,0*	64,0 – 92,0	11	5
Degradabilidad del N (K= 6; %)	77,0*	72,0 – 93,0	7	17

(Fuente: Adaptada de Feedipedia, 2016).

El asterisco * indica que el valor medio se obtuvo mediante una ecuación; DE: desviación estandar; N: número de muestras.

Cuando se compara con otra leguminosa habitualmente utilizada como el guisante forrajero (ver tabla 4), los resultados analíticos muestran un valor nutritivo superior para los guisantes, con mayor contenido en proteína (23,4% vs. 18,1%, P<0,01), menor cantidad de fibra neutro detergente (41,3% vs. 47,7%, p<0,05) y mayor digestibilidad de

la materia orgánica (77,9% vs. 53,6%, $p < 0,001$), lo que se traduce también en un aporte energético superior (11,1 vs. 7,9 MJ/kg MS, $P < 0,001$). Con respecto a la ensilabilidad, a igualdad de capacidad tampón en ambos forrajes (250 y 242 meq/kg de MS, $P > 0,05$), las habas presentan mayor contenido en azúcares solubles que los guisantes (12,88% vs. 9,45%, $P < 0,05$), lo que significa que disponen de mayor cantidad de sustrato para que los microorganismos presentes en el forraje lleven a cabo la fermentación láctica y, por tanto, tendrán mayor facilidad para ensilar correctamente. Tras un periodo de fermentación, en los ensilados resultantes se mantienen las diferencias entre forrajes (ver tabla 5). Así, el ensilado de guisante mantiene mayores contenidos en proteína, digestibilidad y aporte energético que el ensilado de haba (Martínez-Fernández et al., 2016). Según Fraser et al. (2001), aunque la ingestión voluntaria es similar en los dos tipos de leguminosas forrajeras la digestibilidad de guisantes es superior en comparación con el haba, así como la retención de nitrógeno.

Tabla 4. Valor nutritivo, digestibilidad, aporte energético y características de ensilabilidad de habas y guisantes forrajeros en el momento de la cosecha

Forraje	PB %sms	FND %sms	Dvivo %	EM MJ/kgMS	AzSol %sms	CT meqNaOH/kgMS
Haba forrajera	18,1	47,7	53,6	7,9	12,9	242
Guisante forrajero	23,4	41,3	77,9	11,1	9,5	250
P	**	*	***	***	*	ns

(Fuente: Martínez-Fernández et al., 2016).

PB: Proteína bruta; FND: Fibra neutro detergente; Dvivo: Digestibilidad in vivo predicha; EM: Energía metabolizable; AzSol: Azúcares solubles; CT: Capacidad tampón. P: significación estadística; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; ns: $P > 0,05$.

Tabla 5. Producción de efluente, características nutritivas y fermentativas, digestibilidad y aporte energético estimado de los ensilados de habas y guisantes, ambos en monocultivo

Forraje (F)	Haba (H)	Guisante (G)	P
Efluente (l/t de forraje)	14,17	21,97	ns
pH del jugo	3,89	4,37	**
Materia seca (%)	21,66	25,55	ns
Cenizas (%sms)	8,58	10,31	***
Proteína bruta (%sms)	16,60	22,29	***
Fibra bruta (%sms)	32,59	26,46	***
Fibra neutro detergente (%sms)	54,18	38,23	***
Fibra ácido detergente (%sms)	41,98	35,18	***
Materia orgánica digestible (%)	67,76	53,65	***
Digestibilidad in vivo de la MO (%)	69,46	81,76	***
Energía metabolizable (MJ kg/MS)	10,16	11,74	***
NH ₃ (% sobre N total)	13,53	12,37	ns
Ácido láctico (%sms)	10,83	8,46	ns
Ácido acético (%sms)	1,63	1,92	ns

(Fuente: Martínez-Fernández et al., 2016).

MO: Materia orgánica; %sms: datos referidos a materia seca residual;

P: significación estadística: ***: P≤0,001; **: P≤0,01; ns: P>0,05.

3.2.3. Contenido de moléculas bioactivas de las leguminosas

Una característica de las leguminosas forrajeras es su contenido en moléculas bioactivas. Dentro de este grupo de componentes secundarios, los más comunes son los taninos condensados (TC). En la tabla 6, se muestra el contenido de taninos condensados en diferentes especies forrajeras según diferentes autores siguiendo el método de extracción de Butanol-HCl.

Tabla 6. Contenido en taninos condensados de algunas leguminosas según diferentes autores

Leguminosa	Taninos condensados (g/kg MS)	Referencia
Lotus grande (<i>Lotus pedunculatus</i>)	50-77	Terril et al. (1992)
Zulla (<i>Hedysarium coronarium</i>)	30-45	Terril et al. (1992) Barry y McNabb (1999)
Trébol pata de pájaro (<i>Lotus corniculatus</i>)	47 11,6	Terril et al. (1992) Broderick et al. (2017)
Alfalfa (<i>Medicago Sativa</i>)	0,5	Barry y McNabb (1999)
Haba forrajera (<i>Vicia faba L</i>)	4,8 0,8-24 (semillas) 56,4 (semillas)	Feedipedia (2016) Zitari (2008) Molina Acaide (2016)
Esparceta (<i>Onobrychys viciifolia</i>)	13,6 35,6	Theodoridou (2010) Copani (2015)
Trébol rojo (<i>Trifolium Pratense</i>)	2	Copani (2015)

En un estudio realizado por Copani (2015) sobre la esparceta, este autor no encontró diferencias significativas entre las concentraciones de taninos condensados al pasar del forraje verde, a prehenificado y posteriormente al ensilado (35,6 vs. 25,6 vs. 29,6 g/kg MS). Sin embargo, es esperable que el contenido de taninos condensados del forraje verde sea mayor que el prehenificado y el ensilado, ya que como resultado de la exposición al sol durante el prehenificado, se produce una pérdida de hojas y por lo tanto la tasa de taninos debería disminuir. Por otra parte, durante el proceso de ensilado, a consecuencia de la ruptura de las paredes celulares, se produce la liberación de taninos disminuyendo su contenido.

Además, según Copani (2015), el contenido de TC en el ensilado de esparceta es mayor que el de trébol rojo (2,4 g/kg MS) y también que el de la mezcla de ambas leguminosas (14,9 g/kg MS).

En las habas, los TC se acumulan en los tegumentos de las semillas y se suelen considerar como factores anti-nutricionales. Sin embargo, la presencia de estos compuestos permite la protección de las proteínas contra la degradación en el rumen y, por lo tanto, promueve la digestión post ruminal. Además, los TC tienen otros efectos beneficiosos sobre la sanidad del animal, el suelo y el medio ambiente en general (Martinez *et al.*, 2004).

El contenido de compuestos secundarios en la haba forrajera es diferente según la variedad utilizada. Así, hay algunas variedades libres de taninos y otras que contienen TC en un nivel que oscila entre 0,5 y 1% sobre MS (Tabla 7). Para diferenciar entre variedades libres o con presencia de TC, se considera que los cultivos ricos en taninos en Europa tienen un gran punto negro en los pétalos (Crépon *et al.*, 2010).

Tabla 7. Composición en compuestos secundarios (g/kg MS) del haba forrajera

Compuestos secundarios	Variedad	Medio	Intervalo	DE	N
Taninos (equivalente en ácido tánico)	Con poco taninos	2	0,0 – 6,5	2,5	15
Taninos condensados (equivalente en catequina)		0,1	0,0 – 0,2	0,1	7
Taninos (equivalente en ácido tánico)	Todas las variedades	6,5	0,9 – 12,4	2,3	141
Taninos condensados (equivalente en catequina)		4,8	0,1 – 11,3	3,6	20

(Fuente : Feedipedia, 2016).

DE: Deviación estandar, N: número de muestras.

3.3. Compuestos secundarios (moléculas bioactivas)

Los compuestos secundarios son metabolitos orgánicos sintetizados por determinadas especies vegetales que no tienen un papel directo sobre su crecimiento o reproducción. A diferencia de los compuestos primarios, su ausencia no le impide la supervivencia, si bien se verá afectada, incluso gravemente, porque desempeñan funciones en el desarrollo de la planta, su ecología o de protección frente a predadores.

Los compuestos secundarios se sintetizan por las plantas en pequeñas cantidades. Su contenido depende de la familia, el género y la especie vegetal (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009)

Se agrupan en cuatro clases principales:

- **Compuestos fenólicos:** Cumarinas, flavonoides, lignina y **taninos**
- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos
- Alcaloides: cocaína, morfina, atropina, colchicina, quinina.

En este trabajo nos centraremos en los compuestos fenólicos, principalmente **fenoles totales** y **taninos**.

3.3.1. Compuestos fenólicos (fenoles totales)

Los compuestos fenólicos incluyen una amplia gama de compuestos químicos que comprende al menos un anillo aromático al cual se unen uno o más grupos hidroxilo. Se encuentran presentes en todas las plantas y tienen un papel importante en el crecimiento y en la defensa contra los predadores e insectos patógenos (Bulter, 1992). Constituyen un grupo heterogéneo debido a su biosíntesis en diferentes rutas. Las dos rutas básicas son la del ácido shikímico, que es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los polifenoles, y la del ácido malónico, que es fuente importante de fenoles en bacterias y hongos (Taiz y Zeiger, 2006).

Existen en torno a 8000 compuestos fenólicos que varían desde moléculas simples, tales como ácidos fenólicos o benzoquinonas a compuestos altamente polimerizados tales como taninos y flavonoides (Ucero et al., 2007). El tipo principal de polifenoles que está presente en las leguminosas y los cereales son los flavonoides y los taninos (Ucero et al., 2007).

Los compuestos fenólicos se valoran mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu ya que los fenoles se oxidan en este reactivo. La reacción es de óxido-reducción en la cual el ion fenolato es oxidado bajo condiciones alcalinas, mientras que el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico en el que el reactivo de Folin se reduce, produce una solución coloreada de azul (Singleton et al, 1991).

3.3.2. Taninos

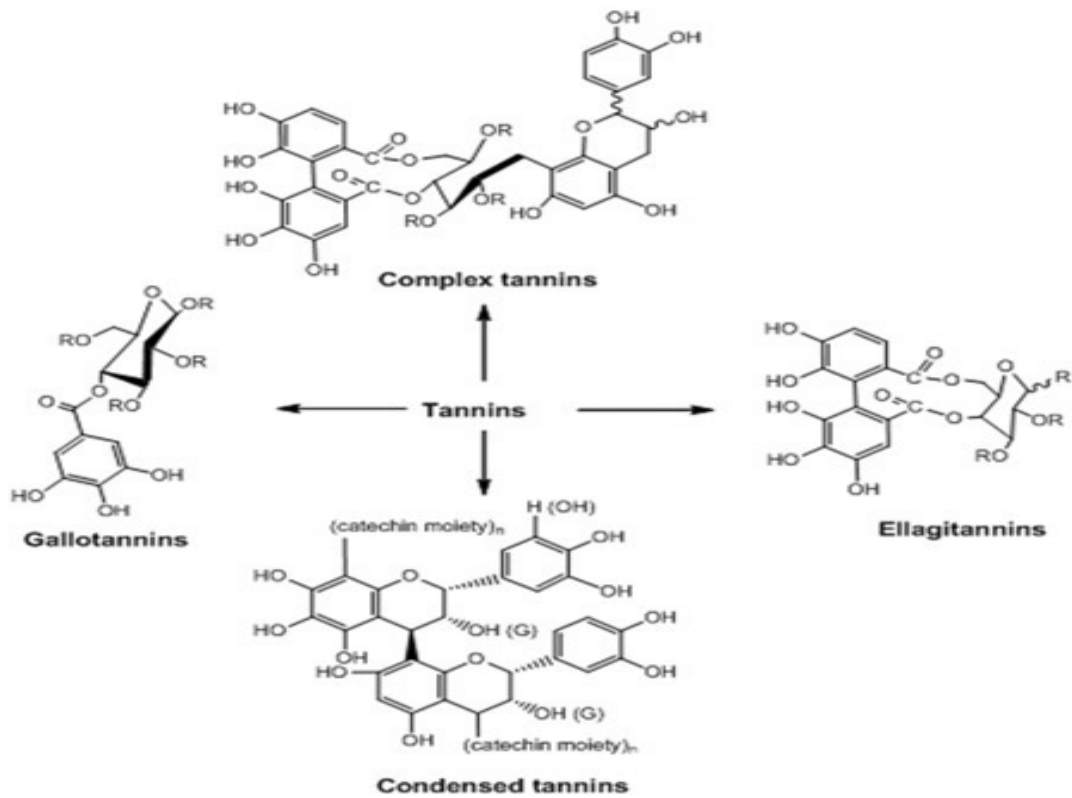
Los taninos son grupos muy complejos de compuestos secundarios de las plantas que pueden ser consumidas por los rumiantes (Hervás, 2001).

Los taninos son polímeros polifenólicos de grupo de los flavonoles, derivados de los flavonoides, solubles en agua, de peso molecular relativamente elevado y una complejidad variable (Makkar, 2003). Se sitúan en las vacuolas de las células vegetales y están presentes en algunas leguminosas (Aufrere et al., 2013).

Estos compuestos forman complejos con proteínas principalmente y, en menor medida, con hidratos de carbono debido a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos (Patra y Saxena, 2011).

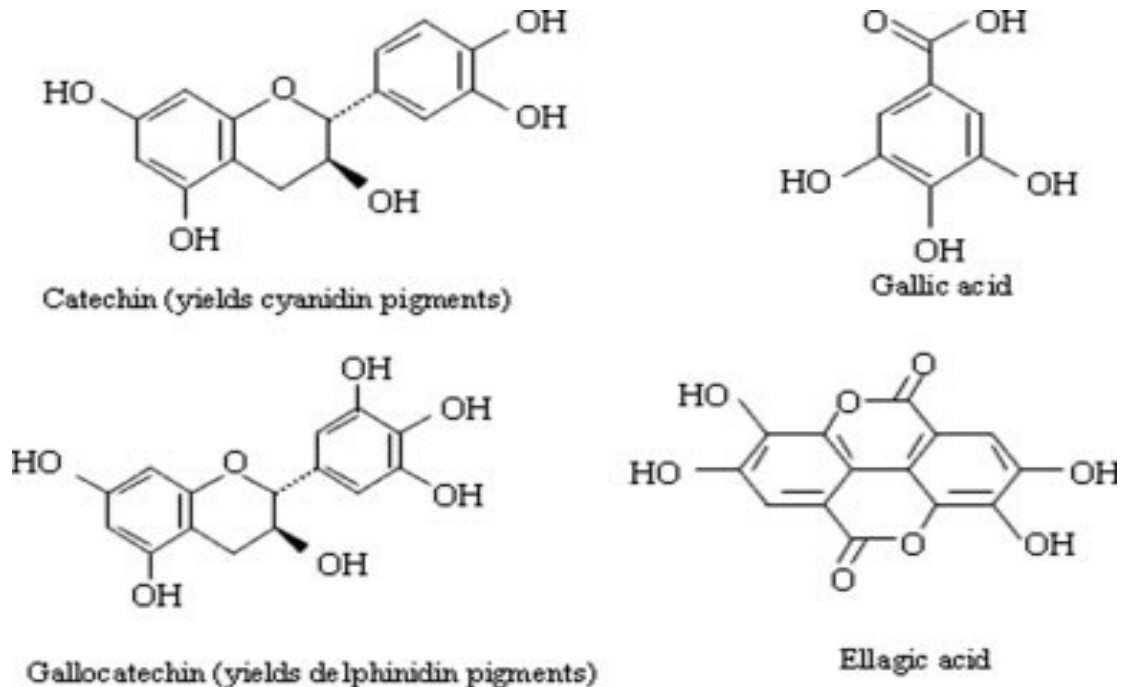
Según Hervás (2001) hay dos tipos de taninos (Figuras 1, 2)

Taninos condensados	Procianidinas Prodelphinidas
Taninos hidrolizables	Galotaninos Elagitaninos



(Fuente: Khanbabae y van Ree, 2001).

Figura 1. Clasificación de taninos



(Fuente: Patra y Saxeana, 2011).

Figura 2. Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina y galocatequina) e hidrolizables (ácido gálico y ácido elágico)

Los taninos condensados están mas distribuidos en la naturaleza que los taninos hidrolizables y se encuentran en las hojas de arboles, arbustos y leguminosas.

Las proantocianidas (oligómeros y polímeros) son compuestos polifenólicos conocidas por el nombre común de **taninos condensados**. Las proantocianidas se componen de flavonoles conectados a través de un carbono interflavánicos y son resistentes a la hidrolisis. Las unidades de flavonoles se dividen en dos grupos según el número de grupos de hidroxilo en el anillo B (Mueller- Harvey y McAllam, 1992).

Se les llama procianidinas (PC) cuando están formadas a partir de oligómeros de catequina y epicatequina y los dos grupos hidroxilo están presentes en el anillo terminal, mientras que se llaman prodelfinidinas (PD) cuando se forman a partir de galocatequina o epigalocatequina y cuando tres grupos hidroxilo están presentes. Se clasifican en formas isoméricas cis y trans: la forma cis está relacionado con los grupos de sustitución en la misma dirección, mientras que la forma trans se relaciona con los grupos de sustitución en la dirección opuesta (Mueller-Harvey, 2006).

Los **taninos hidrolizables** son raros en la naturaleza o existen en cantidades limitadas. Se encuentran más en hojas, frutas, y vainas de las plantas (Min et al., 2003). Se componen de un núcleo compuesto por un glúcido, produciendo una esterificación de grupos hidroxilo con acidos fenólicos como el ácido gálico y elágico (Hervás, 2001).

La toxicidad de los taninos depende del tipo y la dosis. El peso molecular de los taninos varía de 500 a 3000. Los taninos hidrolizables son más tóxicos a causa de su bajo peso molecular en comparación con taninos condensados que son menos absorbentes a causa de su elevado peso molecular (Reed, 1995).

La solubilidad de los taninos en agua depende de su peso molecular y su grado de polimerización. También son solubles en acetona y alcoholes, Por lo tanto, el rendimiento óptimo de la extracción se obtiene generalmente por soluciones de acetona-agua o metanol-agua.

3.3.2.1. Métodos analíticos de medida de taninos

Existen diferentes metodologías para la cuantificación del contenido en taninos presente en una especie vegetal que incluyen métodos colorimétricos, comatográficos, químicos y biológicos y que se detallan a continuación:

- **Ensayo del ácido butanol (HCl-butanol)**

Makkar y Beever (2013) mencionaron que Bate-Smith fue la primera persona que desarrolló este método, en 1954, con el objetivo de detectar los taninos en los tejidos de plantas. Posteriormente Porter et al. (1986), desarrollaron un método que se basa en la despolimerización oxidativa del ácido clorhídrico catalizador (HCl) de los taninos condensados. Se considera como el método más utilizado y conocido para cuantificar los taninos condensados. De hecho, su principio consiste en una extracción acetona-agua y una despolimerización oxidativa del ácido clorhídrico catalizador (HCl) de los taninos condensados, produciendo un color rojo (antocianinas) medido por espectrofotometría (Terrill et al., 1992). Este método puede medir el contenido de los TC totales de los alimentos frescos o conservados.

Copani (2015), mencionó algunas limitaciones de este método: en primer lugar, el rendimiento del color puede verse afectado por la estructura de los TC, en segundo lugar es difícil tener extractos puros para un gran número de especies. Además, la temperatura, la extracción, el tipo y el porcentaje del solvente pueden afectar los resultados, y es un método analítico largo que necesita 3 horas de incubación. Con el fin de mejorar el color rojo de las antocianinas, Grabber et al. (2013) modificaron el método de HCl-butanol sustituyendo el HCl por 50% (v/v) acetona/agua con la adición del hierro en el medio de extracción.

- **Ensayo de vainillina**

Como los TC tienen la capacidad de unirse con numerosos compuestos, este ensayo está basado en su reacción con la vainillina formando complejos coloreados. Este procedimiento de la vainillina-HCl es inadecuado para determinar los taninos unidos a la fracción fibrosa ya que no hay desarrollo de color con esta fracción (Terrill et al., 1992).

Sun et al. (1998), con el propósito de optimizar el ensayo de vainillina, afirmaron que hay varios parámetros importantes que pueden interferir en la reacción vainillina-HCl, como la naturaleza y la concentración del ácido, la temperatura, la concentración de la vainillina, el contenido de agua y el tiempo de reacción. Otra cosa a tener en cuenta es la reacción de la vainillina con las catequinas y con proantocianidinas ya que la cinética de las reacciones es marcadamente diferente. Por ello, para estimar con precisión las catequinas y proantocianidinas que existen simultáneamente en tejidos de la planta, es necesario separarlas unas de otras.

- **Reacción de Tiolisis**

Esta reacción está basada en la rotura del enlace interflavonal TC por acción del mercaptano de bencilo que divide las moléculas de los TC en flavonoles monoméricos. Una vez que la degradación tiolítica se termina, los extractos obtenidos son analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección mediante espectrometría de masas (HPLC MS) para obtener la información estructural (Copani, 2015).

Engoström et al. (2014) desarrollaron un método de ultra-rendimiento por cromatografía de espectrometría de masas en tandem (HPLC MS) con el fin de analizar los taninos cualitativa y cuantitativamente de una manera rápida. Este método requiere una pequeña cantidad de material vegetal para el ensayo y un tiempo menor de análisis ya que el tiempo necesario para un análisis completo de TC precisa tan sólo de 10 minutos.

- **Ensayo de la precipitación de la proteína o de difusión radial**

Hagerman (1987) desarrolló un método sensible y específico para cuantificar los taninos que se basa en la difusión de taninos en una proteína contenida en un gel, de manera que se desarrolla una precipitación visible en forma de disco. En este método, se pone el extracto vegetal con el gel en un pocillo formando un complejo entre los taninos y la albúmina de suero bovino embebido en una solución de ágar. Los taninos del extracto de la planta se difunden en el gel y se unen con la proteína. Como resultado de esta unión se forma un círculo opaco cuyo diámetro será proporcional a la cantidad de taninos en el extracto. Este método analítico es sencillo, además ninguno de los dos complejos ni reactivos requieren equipamiento instrumental.

➤ **Método del polietilenglicol**

Este método consiste en la incubación con un agente tanino-complejante como es el polietilenglicol (PEG). En este método, el polietilenglicol, en un sistema de fermentación ruminal *in vitro*, tiene la capacidad de unirse a los taninos y romper los complejos tanino-proteína. Tras la ruptura, la diferencia entre la liberación de gases y la producción de la masa microbiana en ausencia y presencia de PEG permite medir la actividad de taninos dependiendo de los efectos sobre la fermentación del rumen (FAO/IAEA, 2000).

3.4. Efectos de los taninos en la dieta del vacuno

3.4.1. Efecto sobre la ingestión y la digestión

Copani (2015) mencionó que los taninos tienen un efecto positivo en la calidad del ensilado, ya que limitan la degradabilidad de la proteína en el silo mejorando la fermentación láctica y, posteriormente, mejorando eficazmente el valor de nitrógeno del ensilado.

Según Lombardi et al. (2015), la ingestión voluntaria de algunos cultivos forrajeros bioactivos (trébol y achicoria) es mayor cuando se ofrecen en forma conservada en comparación con el forraje fresco.

En la cavidad oral, la masticación conduce a la ruptura de las células de los tejidos de la planta, entonces los TC pueden unirse a las proteínas salivales, lo que reduce la palatabilidad y el consumo debido a la sensación seca y amarga causada por la contracción de los conductos salivales. Además, pueden formar complejos con los carbohidratos de la pared celular no degradables por los microbios del rumen, reduciendo la velocidad de la digestión del rumen y la ingestión voluntaria (Reed, 1995).

El contenido en TC también puede afectar el proceso fermentativo en el rumen. Así por ejemplo, en el estudio de Min et al. (2003), se mostró que el cambio de una dieta de raigrás (pobre en TC) a otra de *Lotus corniculatus* (rica en TC) provocó una disminución de la población proteolítica del rumen.

Waterman (1999) mostró la existencia de una correlación negativa entre la solubilidad de TC y su asociación con las proteínas; es decir, que la baja solubilidad permite una fuerte unión. Esta unión TC-proteínas, reduce la degradabilidad de las proteínas en el rumen y en consecuencia permite que su contenido en el intestino sea mayor (Min et al., 2003; Makkar, 2003). Esta protección de las proteínas en su paso a través del rumen aumenta la eficiencia de producción de las vacas. La interacción de los taninos con las proteínas en el tracto digestivo según Mueller-Harvey and McAllan, (1992), se debe a que las proteínas tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno que son estables en el rumen a valores entre pH 3,5 y 8 y se disocian cuando el pH cae por debajo 3,5 (como en el abomaso, pH 2,5 a 3) o es mayor de 8 (por ejemplo, en el duodeno, pH 8). La proteína liberada de este complejo proporciona los aminoácidos para la digestión y su absorción en el intestino delgado a un pH de 8 a 9 (Mangan ,1988).

En este sentido, Frutos et al. (2000) trataron harina de soja con diferentes dosis (0, 1, 4, 7, 9, 13 y 20%) de ácido tánico o extracto de TC del quebracho comercial, lo que redujo significativamente la extensión de la degradación de proteína bruta en el rumen incluso a la dosis más baja. Con respecto a la digestibilidad intestinal de la proteína no degradable, no observaron efectos negativos hasta que se alcanzó la dosis de 13% con ácido tánico. Posteriormente, Frutos et al. (2004) encontraron que la adición de TC (taninos de quebracho) reducen la concentración de amoníaco, con un 19% menos en el heno de alfalfa debido a la inhibición de la degradación ruminal de proteínas resultando de la alta afinidad entre los radicales hidroxilos de los grupos fenólicos y el carbonilo grupos de proteínas. Además, observaron una reducción de la producción de los AGV del 9%.

Cuando las ovejas se dosificaron intraruminalmente con diferentes cantidades de TC de extracto de quebracho (0, 0,5, 1,5 y 3,0 g/kg de peso vivo por día, equivalentes a 0, 28, 83 y 166 g/kg MS en la dieta), se encontró que todos los animales consumieron todo lo que se ofreció, a excepción de aquellos que habían recibidos la dosis más alta (166 g/kg MS). Sin embargo, el consumo voluntario era prácticamente nulo después de 5 o 6 días (Hervás et al., 2003).

También hay una interacción negativa entre los TC y los carbohidratos. Una concentración elevada de TC reduce la digestión de los carbohidratos estructurales fácilmente fermentables, esto se puede explicar por la inactivación de las enzimas

microbianas extracelulares y las enzimas digestivas debido a la formación de complejos TC-enzimas. Adicionalmente, los TC pueden interferir con el proceso de adhesión de las bacterias ruminales en la pared celular del forraje y por lo tanto causa una depresión en la digestión de los carbohidratos estructurales (Bae et al., 1993).

Los TC inhiben la acción de las enzimas del fluido ruminal especialmente las pectinasas y celulasas, sobre las leguminosas forrajeras (McSweeney et al., 2001). Con un contenido de 400µg/ml se reduce el crecimiento de las cepas de las bacterias del rumen (Molan et al., 2001).

La unión de los taninos con proteínas e hidratos de carbono impide la disponibilidad de estos nutrientes a los microorganismos (Theodoridou, 2010) y también hacen enlaces con las enzimas inhibiendo sus actividades, además los taninos son agentes quelantes que pueden reducir la disponibilidad de ciertos iones metálicos (Frutos et al., 2004) necesarios para el metabolismo de los microorganismos del rumen (Mueller-Harvey and McAllan, 1992). Liao et al. (2004) indican que la solubilidad en agua de los TC puede reducir su papel agente quelante de estos iones.

Diversos autores han evaluado el efectos de la presencia de TC en la dieta sobre la ingestión voluntaria, obteniendo resultados contradictorios. Así por ejemplo:

- Aerts et al. (1999), mostraron que los forrajes que tienen concentraciones de TC del orden de 20-40 g/kg MS afectan positivamente el metabolismo del nitrógeno, pero concentraciones de 60-120 g/kg MS reducen la ingestión voluntaria, la eficiencia digestiva y la productividad del animal.
- Barry y McNabb (1999), indican que la ingesta de un forraje que contiene TC entre 20-50 g/kg MS mejora la eficiencia y la productividad de las vacas ya que aumenta la digestibilidad de la proteína, pero una concentración mayor a este valor reduce la digestibilidad de la proteína dietética.
- Alonso-Díaz et al. (2009), afirmaron que el consumo de taninos no afecta a la ingestión pero aumenta la selección de alimentos.
- Otero e Hidalgo (2004), encontraron que los taninos condensados pueden reducir la ingestión voluntaria cuando su concentración en los forrajes llega hasta el 6-10% de MS.

- Frutos et al. (2004), afirmaron que una concentración elevada de taninos condensados reduce la palatabilidad y la ingestión voluntaria de los alimentos.
- Aufrere et al. (2013), indican que cuando el contenido de los TC está entre 50-60 g/kg MS no hay efecto negativo sobre la ingestión y la digestión.

Si nos centramos en los efectos sobre la ingestión y la digestión de dietas que contienen haba forrajera, encontramos resultados prometedores, ya que la asociación de la haba forrajera con raigras italiano constituye una alternativa viable como cultivo de invierno para rotar con el maíz, y presenta en monocultivo un mayor rendimiento de proteínas, energía y MOD comparables a los de raigras italiano en monocultivo (Baizán et al., 2015).

Según Brunschwig et al., (2004), en dietas isoprotéicas y isoenergéticas, la sustitución de la harina de colza por habas forrajeras no afecta ni a la ingestión total voluntaria ni a la producción ni la composición de leche. Borreani et al. (2009) también mostraron que, con los ensilados de haba forrajera, después un período de prehenificación en buenas condiciones meteorológicas y con la adición de un inoculante, hay una mejora en la utilización de la proteína en el intestino delgado limitando su degradación en el rumen. Ahora bien, la tasa de inclusión máxima recomendada es del 30% de ensilado de haba en la ración (Becker et al., 2012).

En vacas de alto rendimiento (25-30 kg de leche/día) alimentadas con un concentrado que contiene un 20% de habas, los factores antinutricionales no afectaron a la ingestión, ni a la digestión ruminal o el metabolismo mineral (Melicharová et al., 2009). Estos autores añadieron que cuando la ración con haba representó el 50% del suministro de proteínas, la sustitución de 4 kg de semillas crudas con 4 kg de semillas extrusionadas no tuvo ningún efecto sobre la fermentación ruminal, absorción en el duodeno, el íleon o la excreción fecal, ni a la digestibilidad in vivo de la materia orgánica (MO).

3.4.2. Efecto sobre la producción y la calidad de leche

Una concentración moderada de taninos condensados (20-45 g/kg MS) permite de aumentar la producción lechera de las vacas (Min et al., 2003).

Respecto a la calidad de la misma, Buccioni et al. (2010) y Toral et al. (2016) afirman que los taninos tienen el poder de inhibir el último paso de la biohidrogenación ruminal de los AGPI y por lo tanto favorecer una concentración elevada de CLA (cis 9 trans 11 18:1) en leche sin afectar la digestión de la dieta. Cuando la dosis de taninos es 6 a 8 % de la MS, hay una acumulación de CLA y cuando la dosis es del orden de 2-4-6 8 % de la MS, la concentración de los AGPI totales aumenta en la leche (Carreño et al., 2015).

Arrigo y Dohme (2009) demostraron que la producción de leche y de grasa en vacas que han ingerido alfalfa y esparceta, con un mayor contenido de taninos, es menor en comparación con las que consumieron semillas de sorgo. Cuando vacas lecheras se dosificaron diariamente con 163-326 g de *Acacia mearnsii*, su producción total de leche y también de grasa y proteína se redujo (Grainger et al., 2009). Sin embargo, Benchaar y Chouinardt (2009) confirmaron que la inclusión de 150 g/día de TC procedentes de árboles de quebracho, en dietas de vacuno lechero, no altera el perfil de ácidos grasos de la leche.

Con respecto a la utilización de haba forrajera, McKnight y MacLeod, (1977) indican que las vacas alimentadas con ensilado de haba forrajera producen la misma cantidad de leche y contenidos de proteína y sólidos totales similares a las alimentadas con ensilados de gramíneas, pero con un contenido más alto de grasa. Sin embargo Melicharová et al. (2009), no encontraron efectos significativos al añadir haba a la mezcla de dietas sobre la producción de leche y sus componentes individuales.

La tabla 8 muestra que el haba forrajera tiene una concentración de ácido linoléico superior al raigrás italiano, a la vez que presenta menores contenidos en ácido linolénico, lo que supone una ventaja para lograr productos lácteos saludables ya que el primer derivado de la biohidrogenación del ácido linoléico en el rumen es el CLA y la ingesta por las vacas de forrajes ricos en ácido linoleico causa un incremento lineal de la producción de CLA en la leche (Morales-Almaráz et al., 2010).

Tabla 8. Perfil de ácidos linoléicos y linolénicos (g/100 g ácidos grasos) del haba forrajera (monocultivo y en asociación) en comparación con el monocultivo de raigrás italiano

Acidos grasos	Raigrás italiano	Raigrás italiano+ Haba forrajera	Haba forrajera
Acido linoléico	11,07	18,74	25,93
Acido linolénico	65,85	53,07	35,04

(Fuente: adaptada de Baizán et al., 2015).

3.4.3. Efecto sobre el rendimiento y la calidad de carne

Baumont et al. (2016) confirmaron que los TC juegan también un papel importante en la alimentación de vacuno de carne. El engrasamiento de las canales (grasa intramuscular e intermuscular) de carne de vacuno suplementados con leguminosas bioactivas son mayores y están más coloreadas en comparación con los animales suplementados con soja. Los TC permite un mejor perfil de AG de carne, promoviendo el contenido de CLA, ya que tienen el poder de inhibir la biohidrogenación ruminal con mayor contenido de AGPI en detrimento de los AGS (Baumont et al., 2016).

3.4.4. Efecto sobre la sanidad animal

Un consumo elevado de TC se considera como una solución para los animales que sufren de una intoxicación grave (Hervás et al., 2003). Sin embargo, un consumo elevado de estos compuestos puede influir negativamente en otras funciones del organismo y especialmente la ingestión y la digestión, por eso se debe elegir una cantidad razonable.

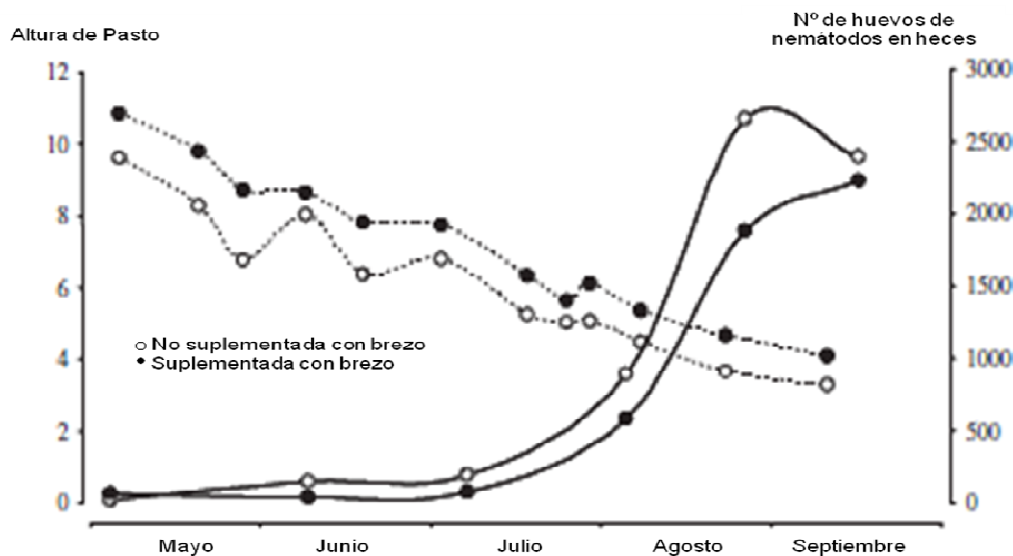
El meteorismo es un riesgo para la sanidad animal que se produce en el caso de ausencia de TC (Baumont et al., 2016) y se puede frenar con el uso de leguminosas (baja en fibra y alta en proteínas). Esta patología es el resultado de la interacción entre los microbios del rumen y las partículas finas del forraje, especialmente en el pastoreo de pastos ricos en leguminosas, formando una espuma que permite la acumulación de gas. La agregación de los TC con la proteína permite la protección contra el meteorismo,

usando un contenido del orden de 1 a 5 g/kg MS (Waghorn y McNab, 2003; Mueller-Harvey, 2006).

Otro efecto positivo de los TC es su acción sobre el control de parásitos intestinales (nematodos gastrointestinales). Es un efecto indirecto debido a la estimulación de la respuesta inmune mediante el aumento de la proporción de proteína en el intestino (Provenza y Villalba, 2010). Hoste et al. (2006) demostraron que los TC forman enlaces con las proteínas y además se unen a las macromoléculas de la cutícula o funda de las larvas, inhibiendo su desarrollo y también a las enzimas secretadas por los gusanos, bloqueando así su actividad.

Algunas leguminosas forrajeras como *Lespedeza cuneata*, que tiene una concentración de 50 g TC/kgMS, permiten reducir el número total de huevos depositados con las heces hasta eliminarlos totalmente (Min y Hart, 2003).

La suplementación de dietas de cabras, en pastoreo continuo en zonas de montaña del norte de España, con brezo, que contiene un 6,4 % de taninos, influye positivamente en la sanidad de estos animales, reduciendo el número de huevos de nematodos en heces (Figura 3). Además, permite disminuir la tasa de mortalidad del ganado (Frutos et al., 2008)



(Fuente: adaptada de Frutos et al., 2008).

Figura 3. Relación entre la cantidad de huevos de nemátodos intestinales en heces (FEC; huevos/g; línea sólida) y la altura de pasto (cm; línea discontinua) en cabras de pastoreo cuyas dietas suplementadas o no con brezo (64 g TC/kgMS)

3.4.5. Efecto sobre los residuos animales

Copani (2015) confirmó que los ensilados de leguminosas, que contienen compuestos secundarios (taninos), mejoran la fermentación, la calidad del ensilado, reduciendo la degradación de las proteínas en el silo con menos pérdidas de nitrógeno hacia el medio ambiente.

Existen numerosos estudios que han demostrado que los taninos reducen las emisiones de CH₄. Los TC pueden modificar el perfil de los AGV, reduciendo el número de protozoos en el rumen. El hidrógeno disponible que sirve como un sustrato para las arqueas metanogénicas se reducirá, y, por lo tanto la cantidad de metano producida disminuye (Bhatta et al., 2009). Baumont et al. (2016) indicaron que los TC presentes en algunas leguminosas (concretamente en la esparceta si su concentración es del orden de 2 % de MS), tienen un efecto contra la metanogénesis. En este sentido, un estudio *in vitro* en el que se utilizó esparceta (Theodoridou et al., 2010) y otro *in vivo* utilizando algunas leguminosas (Waghorn, 2008) confirmaron el papel de los taninos reduciendo la metanogénesis indirectamente a causa de su poder como agente quelante con los

protozoos del rumen y por lo tanto la formación de metano que disminuye significativamente.

Los TC tienen también un efecto positivo sobre el medio ambiente debido a su capacidad de reducir la excreción del nitrógeno urinario y aumentar el fecal, que se considera menos contaminante, con menos emisiones gaseosas (NH_3 , NO) y menos contaminación del suelo y del agua subterránea por los residuos de nitrógeno urinario que son demasiado contaminantes (Baumont, 2016). Sin embargo, Fraser et al. (2001) encontraron que debido a la elevada solubilidad y degradabilidad de la proteína bruta de los ensilados de haba forrajera, las cantidades de la excreción del nitrógeno son superiores en la orina (15 g/día) en comparación con aquellos en las heces (10 g/día).

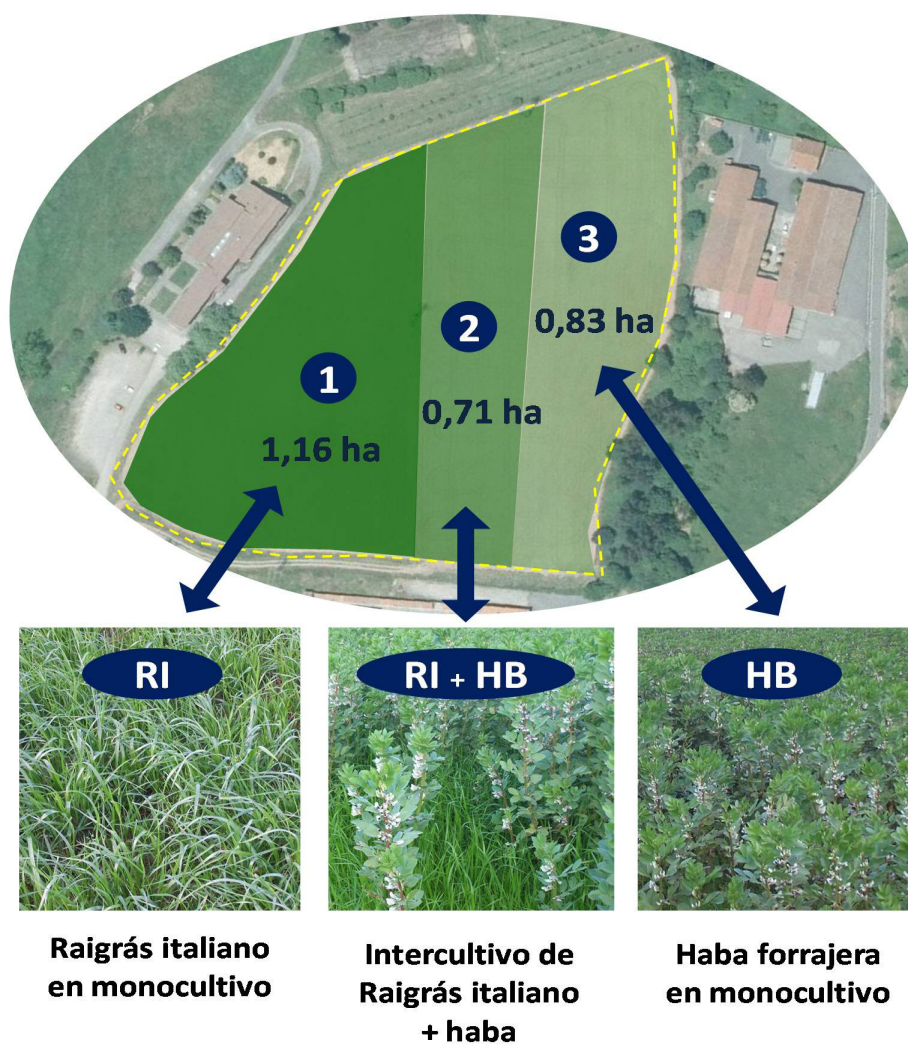
MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales y métodos

4.1. Evolución de moléculas bioactivas en el forraje según su procesado

4.1.1. Material vegetal

El ensayo analítico se realizó sobre tres forrajes diferentes: raigrás italiano (*Lolium multiflorum*, Lam.; RI), haba forrajera (*Vicia faba*, L.; HB) e intercultivo de haba forrajera (60%) y raigrás italiano (40 %); (RI+HB) cultivados en la finca experimental del SERIDA de Villaviciosa (Ver fotografía 5). Los forrajes obtenidos tras la cosecha, fueron analizados tras el corte directo, tras un periodo de prehenificación de 24 horas para eliminar el exceso de humedad antes de la elaboración de los correspondientes ensilados y tras un periodo de fermentación de 170 días. Así mismo se llevó a cabo el análisis de las raciones unifeed derivadas de cada tipo de ensilado.



Fotografía 5. Esquema de localización de los cultivos forrajeros objetos del estudio en la finca experimental del SERIDA en Villaviciosa

4.1.2. Toma de muestras

Para cada tipo de cultivo, el forraje se muestreó en 3 zonas diferentes de cada parcela: baja, media y alta, lo suficientemente separadas entre sí como para considerarse repeticiones independientes. En el momento de la cosecha (primavera de 2016) se tomaron muestras de los forrajes tanto en corte directo como prehenificados durante 24 h. En la parcela con raigrás italiano se lanzó, en cada zona de muestreo, al azar y cinco veces una vara de aluminio de 2 m de largo. La hierba fue segada a la altura del suelo con una segadora manual con un frente de corte de 10 cm, obteniéndose de este modo una muestra de 1 m² en cada zona de muestreo. Las habas y el intercultivo de haba+raigrás se muestreó delimitando en cada una de las tres zonas un cuadrado de 1 m² en el que se segó mediante segadora manual todo el forraje de su interior. Posteriormente en el momento del ensayo de alimentación y en cada periodo, que se tomaron muestras de los ensilados y de las raciones unifeed correspondientes para el análisis de moléculas bioactivas. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C hasta que fueron procesadas para su análisis.

En la tabla 9 se presenta el número de muestras tomadas y repeticiones consideradas en cada una para el análisis de moléculas bioactivas (contenido en **fenoles totales** y **taninos condensados**). El análisis se llevó a cabo en el laboratorio del Centro Tecnológico Forestal y de la Madera (CETEMAS) en Carbayin (Siero), donde se analizaron las 45 muestras resultantes de manera duplicada.

Tabla 9. Número de muestras consideradas para el análisis de moléculas bioactivas

	Forraje verde en corte directo	Forraje prehenificado	Ensilados	Mezclas Unifeed
Muestras	3	3	3	6
Repeticiones	3	3	3	3
Total	9	9	9	18

4.1.3. Procesado de muestras

Todas las muestras previamente congeladas a -20°C fueron liofilizadas para eliminar su contenido en agua por sublimación. Posteriormente, las muestras ya desecadas, fueron molidas en un molino criogénico que requiere el uso de nitrógeno líquido para trabajar a baja temperatura. Este proceso se realizó en la finca experimental del SERIDA de Grado. Para proceder a la molienda, la muestra se picó con tijeras y se introdujo en el molino. Tras la molienda se pesaron aproximadamente 10 g que se introdujeron en un contenedor y se almacenaron en el congelador a -80°C para su traslado al laboratorio de análisis hasta el momento de realizar la extracción fenólica.

Todos los pasos de la metodología empleada para la extracción de moléculas bioactivas se resumen en la figura 4. Este método de extracción permite separar las moléculas de fenoles totales, fenoles de bajo peso molecular, taninos condensados y taninos hidrolizables. Para el objeto de este trabajo de Máster sólo se analizaron los fenoles totales y los taninos condensados.

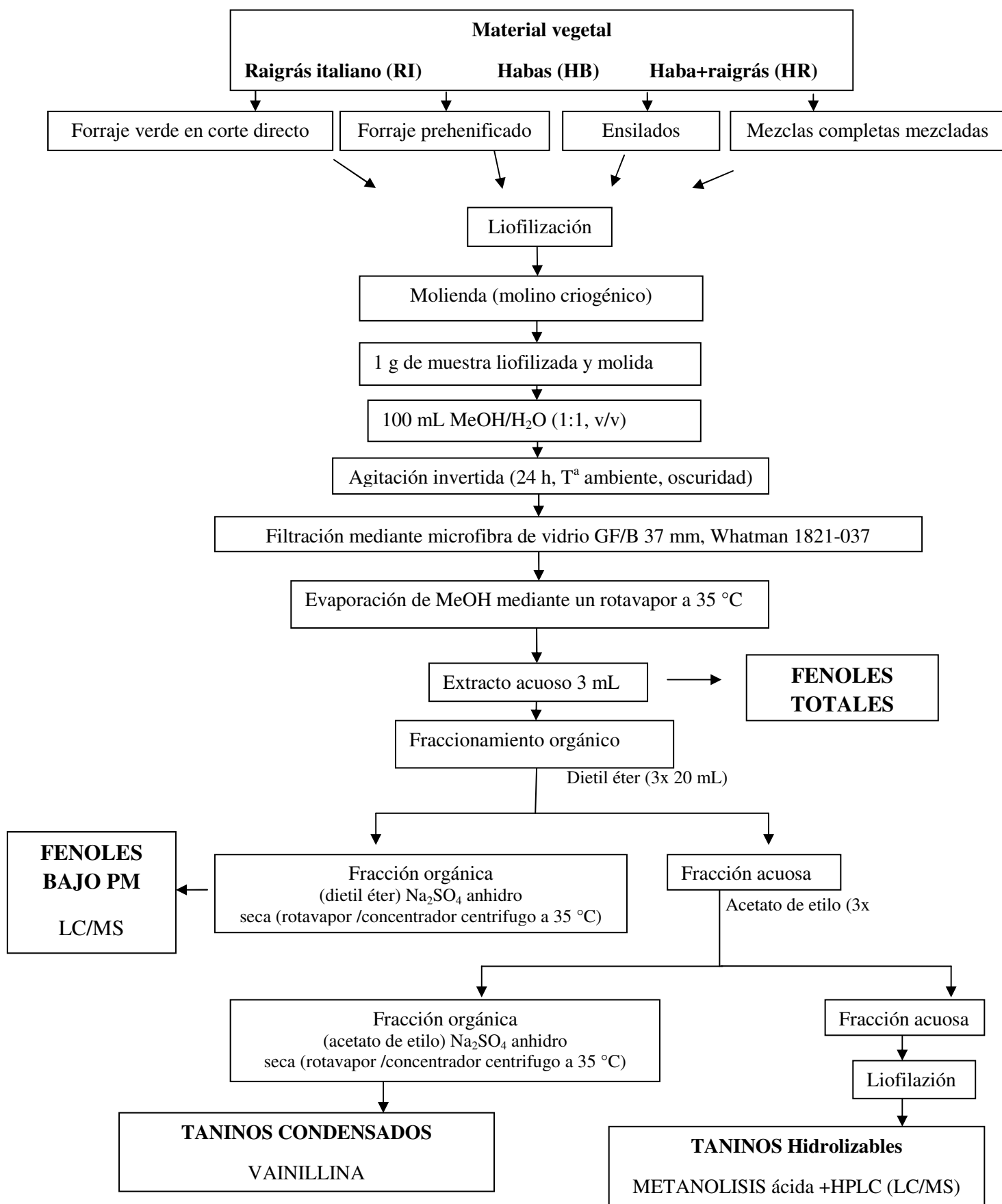
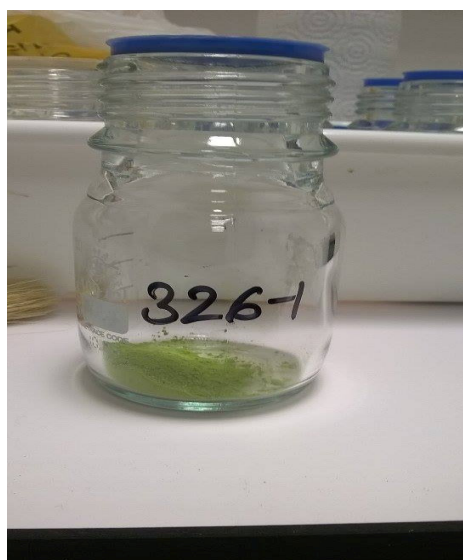


Figura 4. Esquema del procesado, la extracción fenólica y el análisis de fenoles y taninos condensados

4.1.4. Extracción fenólica

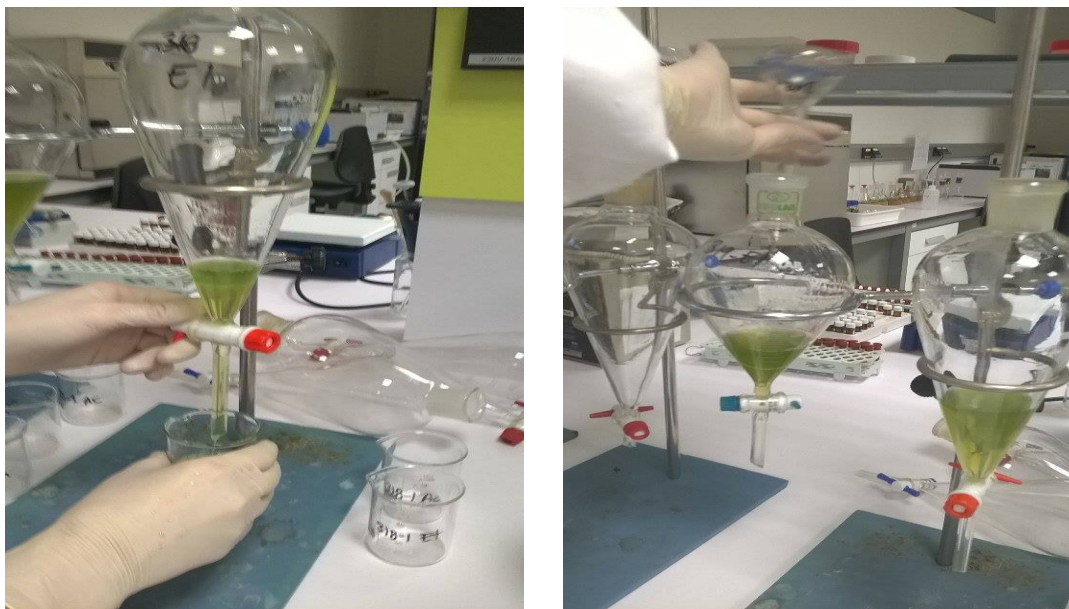
La extracción fenólica se realizó según el protocolo de referencia descrito por Sanz et al. (2010). Para ello, se pesó 1,0 g de cada muestra liofilizada y molida, se añadieron 100 mL de metanol y agua 1/1 (v/v), fueron sometidas a una agitación invertida a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 h utilizando un agitador REAX 2 de Heidolph Instruments (Schwabach, Alemania). A continuación, las muestras fueron filtradas utilizando un disco de microfibras de vidrio GF/B de 37 mm de diámetro (Whatman 1821-037). El metanol se evaporó mediante un rotavapor a 35 °C. Una vez eliminado el metanol, se tomaron 3 mL del extracto acuoso (50 mL) que se conservaron a - 20 °C para el análisis de **fenoles totales** (Ver pasos de la extracción en la fotografía 6).



Fotografía 6. Pasos de la extracción fenólica

El resto del extracto acuoso se dividió en dos alícuotas para realizar el fraccionamiento orgánico. Sobre la primera alícuota se realizaron tres extracciones con 20 mL de dietil éter para separar la fase orgánica (que contiene los fenoles de bajo peso molecular) de la fase acuosa. En la segunda alícuota se hicieron tres extracciones con 20 mL de acetato de etilo para separar la fase orgánica (que contiene los taninos condensados) de la fase acuosa (ver detalles del fraccionamiento orgánico en la fotografía 7).

A continuación, se eliminaron en ambas alícuotas los restos de agua de las fracciones orgánicas con adición de N_2SO_4 anhidro para evaporación del solvente orgánico mediante el rotavapor a $35^\circ C$ y concentrador centrífugo a $35^\circ C$. Finalmente, se conservaron los residuos secos en vacío a $-80^\circ C$ hasta su cuantificación mediante el ensayo de vainillina.



Fotografía 7. Fraccionamiento orgánico con dietil éter y acetato de etilo

4.1.5. Cuantificación del contenido de fenoles totales

Para la cuantificación del contenido fenólico mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, se utilizaron las alícuotas acuosas del fraccionamiento y conservadas a $-20^\circ C$. Se utilizó ácido gálico como patrón de referencia con el fin de expresar el contenido fenólico total como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG/g MS).

Las concentraciones de ácido gálico disuelto en agua miliQ para la curva de calibración fueron: 0,0125; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,6 mg ácido gálico/mL. El orden y la proporción de muestra o patrón y de reactivos empleados en el ensayo de Folin-Ciocalteu fue la siguiente:

Muestra (o patrón): H₂O: Reactivo de Folin-Ciocalteu: Na₂CO₃ 20 % (m/v) acuoso 4,8: 59,5: 7,1: 28,6 (% , v/v/v/v). Esta proporción es resultado de la adaptación del ensayo a microplaca de 96 pocillos, siendo los volúmenes a adicionar en cada pocillo: 10 µl de blanco (H₂O), muestra o patrón (ácido gálico) + 125µl de H₂O + 15 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu + 60 µl de Na₂CO₃ 20 % (m/v) acuosa.

Una vez añadidos todos los reactivos, se llevó la microplaca al espectrofotómetro (lector de microplacas Synergy HT de BIOTEK Instruments, Winoosk, EEUU) que incubó en agitación durante 30 min a 25 °C y realiza la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica (DO) a 750 nm. Las medidas espectrofotométricas se realizaron por triplicado en la microplaca de 96 pocillos. Cada placa contenía una curva patrón además de las pertinentes muestras y blancos.

4.1.6. Cuantificación del contenido en taninos condensados

La cuantificación de **taninos condensados** se realizó según el método de Sun et al. (1998). Los taninos condensados se analizaron en los residuos sólidos procedentes de la evaporación del acetato de etilo de la fracción orgánica, mediante el ensayo de vainillina, empleando la (+)- catequina hidratada como patrón para la curva de calibración. La cuantificación de los taninos condensados se expresó como µg equivalentes de (+)- catequina por g de materia seca (µg EC/g MS).

Las concentraciones de (+)- catequina usadas para la curva de calibración fueron: 0,015; 0,03; 0,07; 0,125; 0,25; 0,35 y 0,5 mg/mL. Las redisoluciones de las muestras, disolución y diluciones de la (+)- catequina se realizaron con MeOH.

El orden y los volúmenes añadidos por cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos empleada en este ensayo de la vainillina fueron los siguientes: 50 µL de MeOH (blanco), muestra o (+)- catequina (patrón), 125 µL de vainillina 1 % (m/v, en MeOH) y 125 µL de H₂SO₄ 25 % (v/v, en MeOH). Una vez añadidos todos los reactivos, en el

espectrofotómetro (lector de microplacas Synergy HT de BIOTEK Instruments, Winoosk, EEUU), la microplaca se agitó durante 30 s, se dejó en reposo 15 min a 30 °C, transcurridos los cuales se realizó la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica a 500 nm. Las medidas espectrofotométricas se realizaron por triplicado.

4.1.7. Valoración del contenido en taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) se analizaron en el residuo sólido seco procedente del extracto acuoso final liofilizado. 20 mg de este residuo se pesaron en tubos de vidrio de 1,5 cm de diámetro y 10 cm de altura (14 mL) con tapón de rosca resistente a alta temperatura, y se sometieron a una reacción de metanólisis ácida mediante la adición de 2 mL de metanol y 0,2 mL de ácido sulfúrico, en atmósfera de N₂, a 85 °C, en baño de aceite de agitación en las muestras con varilla de agitación magnética de 1 mm x 3 mm a 500 rpm durante 3 h. Una vez atemperada a temperatura ambiente las muestras metanolizadas se filtraron a través de filtros de PVDF Millex-HV de 0,45 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, y se guardaron a 4 °C hasta su análisis por HPLC. Tras la metanólisis, la mayoría de los taninos hidrolizables son degradados a sus unidades constitutivas básicas, ácido gálico (procedente de los galotaninos), que se transforma en galato de metilo por reacción con el metanol en medio ácido caliente, y ácido elágico (procedente de los elagitaninos). Estos dos compuestos, galato de metilo y ácido elágico, son los que se cuantifican por HPLC para expresar el contenido en taninos hidrolizables como miligramos de galato de metilo por gramo de peso seco (mg GM/g PS), para los elagitaninos, y miligramos de ácido elágico por gramo de peso seco (mg AE/g PS), para los elagitaninos. El ácido gálico también se consideró, ya que tras la metanólisis no debe aparecer debido a su transformación íntegra en galato de metilo, pero para asegurar el 100 % de esa transformación se confirmó su ausencia en los cromatogramas de las muestras.

Por falta de tiempo para analizar todos los fraccionamientos realizados, en el presente trabajo se consideran únicamente los contenidos en **fenoles totales** y **taninos condensados**.

4.2. Ensayo de alimentación de vacuno lechero

Para evaluar el efecto sobre la ingestión voluntaria del contenido en fenoles totales y taninos condensados del ensilado de haba forrajera integrado en raciones unifeed para vacuno lechero, se realizó el siguiente ensayo de alimentación.

4.2.1. Animales

Se utilizaron 9 vacas frisonas en el segundo tercio de lactación manejadas en un sistema de producción semi-extensivo con 18 horas de pastoreo y 6 horas de estabulación con acceso a mezclas unifeed balanceadas. Durante el primer periodo de ensayo una de las vacas hubo que ser retirada por un proceso patológico, por lo que sus datos no fueron considerados.

4.2.2. Lugar experimental

El ensayo se llevó a cabo en la finca del SERIDA de Villaviciosa (Asturias). Las vacas se alojaron en una cuadra con estabulación libre, dotada de comederos individuales y monitorizados con el fin de controlar el consumo individual de alimento y provista así mismo de un robot de ordeño con registro automático de producción de leche y muestreo de la misma, así como de un dispensador de pienso suplementario.



Fotografía 8. Vacas alojadas en zona de control de alimentación

4.2.3. Diseño experimental y alimentación

El trabajo con animales se desarrolló bajo las condiciones del 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 fines científicos.

El ensayo de alimentación se realizó siguiendo un diseño en cuadrado latino de 3x3 con tres dietas con diferente nivel de inclusión de ensilado de haba forrajera que fueron ofertadas a 3 grupos de vacas en tres periodos consecutivos de alimentación de 21 días, con 14 días de adaptación y 7 días de muestreo.

Los 3 grupos de animales se rotaron de manera que al final de los 3 periodos de ensayo todos los animales recibieron las tres diferentes raciones como se muestra la tabla 10.

Tabla 10. Esquema de distribución de raciones unifeed a los tres grupos de animales durante los tres periodos de ensayo

Animales	Periodo		
	I	II	III
Grupo 1	R1	R3	R2
Grupo 2	R2	R1	R3
Grupo 3	R3	R2	R1

R1: Ración 1 con ensilado de Raigrás italiano; R2: Ración 2 con ensilado de Haba forrajera; R3: Ración 3 con ensilado de Raigrás italiano + Haba forrajera.

Las vacas recibieron una dieta completa mezclada (TMR o unifeed) constituida por ensilado, paja de cebada, y un pienso mezcla en las cantidades que se muestran en la tabla 11. El cálculo de la ración de los animales se realizó en función de los análisis de laboratorio de los diferentes componentes. Se formularon dietas isoenergéticas e isoprotéicas según los requerimientos del NRC (2001) que fueron consumidas en tres periodos sucesivos por cada uno de los tres grupos de animales preestablecidos.

Además, los animales recibieron un pienso suplementario (no incluido en la mezcla), en el momento del ordeño. De forma complementaria, los animales tuvieron acceso al pasto durante 18 horas diarias en praderas polifitas. Las vacas tenían libre acceso a agua fresca tanto en las parcelas de pastoreo como en la estabulación.

Tabla 11. Cantidades de ingredientes de las diferentes raciones
(kg de MS /vaca/día)

Ingredientes	Ración 1	Ración 2	Ración 3
Ensilado de raigrás italiano	5,14	--	--
Ensilado de haba	--	9,26	--
Ensilado de haba+ raigrás italiano	--	--	7,41
Paja de cebada	0,64	0,64	0,64
Pienso mezcla	5,48	5,48	5,83
Pienso suplementario	3,06	3,06	3,06

*: El pienso suplementario no está incluido en la mezcla unifeed.

Ración 1: con ensilado de Raigrás italiano; Ración 2: con ensilado de Haba forrajera; Ración 3: con ensilado de Raigrás italiano + Haba forrajera.

4.2.4. Determinaciones y controles

4.2.4.1. Control de ingestión

➤ Ingestión de TMR

El consumo de las TMR fue registrado mediante un sistema de monitorización de la ingestión voluntaria basado en el descrito por Bach et al. (2004). Se compone de 9 balanzas (Mettler Toledo IND 425-CC300), de 300 kg de capacidad de pesada con una resolución de ± 100 g, instaladas frente a cada puesto de alimentación. Encima de cada balanza se colocó un cajón de fibra vidrio de 150 L de capacidad, que se llenaba con la oferta diaria de TMR. La entrada a cada comedero está dotada de un lector de presencia (CP-15 de Circontrol) en la parte superior derecha. Dicho lector detecta el paso de un transponder, colocado en la oreja derecha de cada vaca, cada vez que ésta entra o sale al comedero. Registrando el tiempo de entrada y de salida, el lector permite determinar el tiempo utilizado para comer de cada animal. Simultáneamente, el sistema se registra el peso del alimento a la entrada del animal y a su salida, lo que permite, por diferencia de pesos, determinar el consumo de alimento. Los datos fueron procesados usando un programa informático desarrollado por Asturlan de Comunicaciones, S.L. (Gijón, Asturias).

Durante la semana de muestreo, se tomaron diariamente muestras de cada ración TMR. Las muestras se secaron en la estufa de aire forzado a 103°C durante 24 horas con el fin de determinar el contenido de la materia seca. Después, estas muestras se molieron en un molino *Fritsch Pulverisette 25* a través de una criba de 0,75 mm de luz para posteriores análisis al laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA.

➤ Ingestión de piensos

El consumo del pienso suplementario por los animales se registró automáticamente por el dispensador de pienso instalado en el robot de ordeño.

Al inicio de cada periodo del ensayo, se tomó una muestra del concentrado suplementario. Las muestras fueron molidas en un molino *Fritsch Pulverisette 14* a 1 mm de diámetro para su análisis.

➤ Ingestión de forraje verde

Se realizó el control de producción de pasto el primer y el último día del periodo de muestreo, mediante el lanzamiento 5 veces al azar de una barra de 2 metros de largo midiendo la altura de la hierba en 5 puntos a lo largo de esos 2 metros y segando la hierba con una segadora de 10 cm de ancho a lo largo de la misma. Las muestras obtenidas de los cinco lanzamientos fueron acumuladas hasta obtener la producción equivalente a 1 m² y posteriormente fueron pesadas. Se secaron a 60 °C durante 24 h para determinar su contenido de MS (de la Roza et al., 2002), se molieron en un molino *Fritsch Pulverisette 25* provisto de un tamiz de 0,75 mm de diámetro y se almacenaron en bolsas de plástico de cierre hermético para su posterior análisis.

La ingestión de forraje fresco de los animales en pastoreo se estimó mediante el método de estimación del consumo según **los requerimientos** y la respuesta productiva de los animales (energía neta) y el **valor energético de todos los alimentos ofertados** (TMR, pienso y hierba), descrito por Macoon et al. (2003). De este modo la ingestión de hierba en pastoreo (kg MS/vaca) se estimó dividiendo la diferencia entre el total de las necesidades del animal en energía y el aporte de la energía aportada por los alimentos en la estabulación, por la concentración de energía de la hierba según la siguiente ecuación:

$$MSI_{\text{HIERBA}} = (EN_L - EN_{\text{PIENSO}} - EN_{\text{TMR}}) / EN_{\text{HIERBA}}$$

Los requerimientos de energía neta de los animales fueron estimados a partir de la aplicación de las ecuaciones de predicción del NRC (2001). Para ello se aplicó el siguiente procedimiento de ecuaciones donde los requerimientos de energía neta total del ganado lechero (EN_L) corresponde al sumatorio de las necesidades de energía resultantes de las estimaciones siguientes:

$$EN_L = EN_g + EN_l + EN_m + EN_{pv} + EN_p + EN_d$$

1. **Gestación** (EN_g): según los días de gestación y peso del ternero al nacimiento.

- $EN_g = [(0,00318 * D - 0,0352)*(PTN/45)] / 0,218$

Donde:

D = días en gestación entre 190 y 279 días

PTN = Peso de ternero al nacimiento en kg

2. **Lactación** (EN_l): según la producción y el porcentaje de grasa en leche.

- $EN_l = \text{kg de leche por día} * [0,3512 + (0,0962 * \% \text{grasa en leche})]$

3. **Mantenimiento** (EN_m): se calculó en función del peso metabólico del animal ($PV^{0,75}$) y el número de partos:

a) Vacas primiparas: $EN_m = 1,2 * (0,080 * PV^{0,75})$

b) Vacas de segundo parto: $EN_m = 1,1 * (0,080 * PV^{0,75})$

c) Vacas de tercer parto o más = $EN_m = 0,080 * PV^{0,75}$

Donde:

PV = peso vivo

4. **Cambio de peso corporal** (EN_{pv}): De acuerdo con el cambio de PV se calcularon demandas en términos de necesidades energéticas para los animales según NRC (2001). Por cada kg de PV ganado fue asignado el requerimiento de 5,12 Mcal de EN_L , mientras que en el caso contrario, se restaron de las necesidades totales 4,92 Mcal de EN_L por cada kg de PV perdido.

5. **Actividad de Pastoreo** (EN_p): calculada según la ecuación sugerida por Rochinotti (1998):

$$EN_p = 1,2 \text{ kcal} * \text{tiempo de pastoreo (h)} * PV^{0,75}$$

6. **Actividad de desplazamiento** (EN_d): los animales tuvieron que caminar una distancia diaria promedio de 800 metros. De acuerdo con el AFRC (1993), la estimación de la energía neta de esta actividad puede ser calculada usando la ecuación:

$$EN_d = 0,62 \text{ cal/ (kg PV} * \text{ distancia en metros)}$$

La diferencia entre los requerimientos totales de EN_L y la EN aportada por el consumo del TMR y los concentrados en la estabulación representa la EN aportada por el forraje consumido en pastoreo (EN_{HIERBA}). El contenido en EN de cada alimento (TMR, concentrados y forraje) fue calculado de la siguiente manera:

➤ **Forraje fresco:**

La energía neta del forraje fresco fue determinada aplicando la ecuación de predicción de NRC (1988):

$$EN = (0,1569 * EM) - 0,07$$

Donde:

EM = Energía Metabolizable (MJ/kg MS)

El valor de la EM fue estimado según el modelo de MAFF (1984) expresando el coeficiente de digestibilidad de la materia orgánica (Do) como porcentaje de materia orgánica digestible sobre materia seca (MOD):

$$EM = K * MOD$$

Donde:

K = 0,16 (para forrajes frescos y ensilados en vacas lecheras)

MOD = Materia Orgánica Digestible (%), calculada con la formula:

$$MOD = \% MO * (Do/100)$$

Donde:

MO = Materia orgánica (% MS)

Do = Digestibilidad in vivo de la materia orgánica (%) que fue estimada por el método de fibra neutro detergente celulasa (Riveros y Argamentaría, 1987) según la ecuación:

$$Do = 5,76 + (0,57 * De) + (0,36 * FND) + (0,5 * PB)$$

Donde:

De = Digestibilidad enzimática de la materia orgánica (%)

FND = Fibra Neutro Detergente (% MS)

PB = Proteína Bruta (% MS)

➤ TMR y Concentrados :

Se utilizó la misma ecuación que en el forraje verde para calcular la energía neta de lactación de las mezclas unifeed y los concentrados:

$$EN = 0,1569 * EM - 0,07$$

Donde la EM (energía metabolizable en MJ/kg de MS) fue determinada tomando el valor promedio de la energía metabolizable calculada según dos ecuaciones diferentes: MAFF (1984) y ADAS (1985)

$$EM_{MAFF} = 10 * (0,012 * PB + 0,031 * EE + 0,005 * FB + 0,014 * MELN)$$

$$EM_{ADAS} = 11,78 + (0,0654 * PB) + (0,0665 * EE^2) - (0,0414 * EE * FB) - (0,018 * CEN)$$

Donde:

EM_{MAFF} = Energía Metabolizable determinada según el MAFF (1984)

EM_{ADAS} = Energía Metabolizable determinada según el ADAS (1985)

PB = Proteína Bruta (%MS)

EE = Extracto Etéreo (%MS)

FB = Fibra Bruta (%MS)

CEN = Cenizas (% sobre MS)

MELN = Materiales extractivos libres de nitrógeno (%), calculados a partir de la fórmula:

$$MELN = 100 - CEN - PB - EE - FB$$

4.2.4.2. Control de producción de leche

La leche de ambos ordeños (mañana y tarde) fue muestreada en dos días alternos durante el periodo de muestreo. Para ello se utilizó un muestreador automático acoplado al robot de ordeño. Las muestras fueron recogidas en botes de polipropileno con azidol como conservante y enviados refrigeradas a 4 °C para su análisis de macrocomponentes al Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias (LILA, Llanera, Asturias).

4.2.4.3. Análisis de laboratorio

➤ Alimentos

Las muestras de diferentes alimentos (TMR, piensos y forrajes) fueron analizadas en el laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA, acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), conforme a los criterios recogidos en la norma UNE-EN-ISO/IEC 17025 (Nº de expediente LE 930) para determinar sus contenidos en principios nutritivos mediante NIRS: materia seca (MS), cenizas (CEN), proteína bruta (PB) (AOAC, 1984), fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) (Van Soest et al., 1991). En el pienso y la mezcla unifeed se determinó también la fibra bruta (FB), extracto etéreo (EE) (AOAC, 1984) y el almidón (Soldado et al., 2003). La estimación del contenido de la energía metabolizable (EM) en todos los alimentos se hizo según ARC (1980). En todos los forrajes (frescos, prehenificados y ensilados) se realizó una estimación de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica.

➤ Leche

Las muestras de leche fueron analizadas en el Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias (LILA, Llanera, Asturias) donde se realizó el análisis del contenido de la leche en macronutrientes: proteína, grasa, lactosa, extracto seco magro y urea y de células somáticas mediante equipos de reflectancia de infrarrojo medio FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier) acreditados por ENAC (Nº de expediente 246/LE476).

La cantidad de leche individual producida diariamente ha sido corregida por el 4% de grasa (Gaines, 1928) y por energía (Tyrrell y Reid, 1965):

➤ Leche corregida por 4 % de grasa: LCG:

$$\text{LCG} = (0,4*\text{kg leche}) + (15*\text{kg grasa})$$

➤ Leche corregida en energía: LCE: 4% de grasa y 3,3% de proteína:

$$\text{LCE (kg)} = (0,25*\text{kg leche}) + (12,5*\text{kg grasa}) + (7,7*\text{kg proteína})$$

4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se divide en tres ejes:

- Análisis **de la calidad nutritiva de forrajes**: para comparar el valor nutritivo de los forrajes utilizados en el estudio (Raigrás italiano, Haba forrajera + Raigrás italiano y Haba forrajera) según el tipo de conservación (Forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilados y raciones completas mezcladas), se realizó un análisis de varianza utilizando el tipo de forraje y el método de conservación como factores principales.

$$Y = \mu + F_i + C_j + (F \times C)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y = variable dependiente: proteína bruta, materia orgánica digestible y energía

μ = media global

F_i = efecto tipo de forraje: raigrás italiano, haba forrajera o intercultivo de haba + raigrás

C_j = efecto tipo de conservación: forraje verde, prehenificado, ensilado o ración completa mezclada

$(F \times C)_{ij}$ = interacción tipo de forraje x tipo de conservación

e_{ijk} = error estándar

- Análisis del **contenido en fenoles totales y taninos condensados** de los forrajes: con fin de valorar estos dos compuestos secundarios en los forrajes ya citados y valorar su evolución según el tipo de conservación, los resultados de concentraciones de fenoles totales y taninos condensados fueron contrastadas mediante un análisis de varianza considerando el tipo de forraje y de conservación como factores principales según la fórmula siguiente:

$$Y = \mu + F_i + C_j + (F \times C)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y = variable dependiente: contenido en fenoles totales o taninos condensados

μ = media global

F_i = efecto tipo de forraje: raigrás italiano, haba forrajera o intercultivo de haba + raigrás

C_j = efecto tipo de conservación: forraje verde, prehenificado, ensilado o ración completa mezclada

$(F \times C)_{ij}$ = interacción tipo de forraje x tipo de conservación

e_{ijk} = error estándar

➤ **Análisis de la ingestión voluntaria y producción de leche del vacuno lechero:**

Para comparar la ingestión voluntaria en raciones del vacuno lechero y la producción y composición de leche en función del porcentaje de inclusión del ensilado del haba forrajera, los resultados de ingestión fueron contrastadas mediante un análisis de varianza considerando tipo de forraje y periodo como efectos fijos y vaca como efecto aleatorio.

$$Y = \mu + D_i + P_j + (D \times P)_{ij} + V_k + e_{ijkl}$$

Donde:

Y = variable dependiente: ingestión voluntaria, producción de leche, composición de leche

μ = media global

D_i = efecto tipo de dieta: dieta con ensilado de raigrás italiano, dieta con ensilado de haba forrajera o dieta con ensilado del intercultivo de haba + raigrás

P_j = periodo de alimentación: 1-3

$(D \times P)_{ij}$ = interacción dieta x periodo

V_k = efecto vaca: 1-9

e_{ijkl} = error estándar

Todos los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico R (R Core team, 2016).

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Valor nutritivo de los forrajes según el tipo de conservación

➤ Forraje verde

La caracterización de la composición química de los forrajes verdes se presenta en la tabla 12. En el momento de la cosecha, el contenido en materia seca (MS) fue similar para los tres forrajes (18,28 %: raigrás italiano; 17,82 %: haba forrajera; 17,50 %: haba+raigrás). La leguminosa (haba forrajera) tal como cabía esperar, superó al raigrás italiano en contenido en proteína, tanto en monocultivo como asociada con el raigrás italiano en una proporción (60%-40% haba-raigrás). El haba forrajera, al ser una planta de porte erguido presenta un contenido en fibras superior al raigrás. Por ello, el raigrás italiano presentó un contenido más elevado en materia orgánica digestible (MOD) y por lo tanto en energía metabolizable (EM) que el haba forrajera pura y su intercultivo con el raigrás.

Tabla 12. Composición química de los forrajes verdes en el momento de la cosecha

	Raigrás Italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba forrajera
MS (%)	18,28	17,50	17,82
PB (% MS)	8,50	10,83	11,99
FND (% MS)	41,80	46,61	51,59
FAD (% MS)	17,47	22,59	32,66
Dvivo (%)	81,18	72,65	53,70
MO (% MS)	93,03	92,35	92,70
MOD (%)	75,52	67,10	49,80
EM (MJ/kgMS)	12,08	10,74	7,97

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FAD: fibra ácido detergente, FND: fibra neutro detergente, Dvivo: digestibilidad estimada *in vivo* de la materia orgánica, MO: materia orgánica, MOD: materia orgánica digestible, EM: energía metabolizable.

➤ Prehenificado

La composición química de los forrajes tras 24 horas de prehenificación se muestra en la tabla 13. Se observa que el intercultivo del raigrás+haba tiene un contenido mayor de MS (22,77 % vs 18,99 %: haba y 19,95 %: raigrás italiano). El haba forrajera mantiene el contenido mayor de PB. Tras la prehenificación los contenidos en fibra (FND y FAD) se mantienen en comparación con los valores del forraje verde con altas concentraciones en el cultivo de haba forrajera (fibra neutro detergente (FND): 55,65 % MS y fibra ácido detergente (FAD): 33,13 % MS). No aparecen grandes diferencias con respecto al contenido en MOD y EM en los forrajes ensayados con respecto a los observados en el forraje verde en el momento de la cosecha.

Tabla 13. Composición química de los forrajes prehenificados

	Raigrás Italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba forrajera
MS (%)	18,95	22,77	18,99
PB (% MS)	8,53	10,02	12,58
FND (% MS)	45,49	46,11	55,65
FAD (% MS)	19,15	22,56	33,13
Dvivo (%)	77,18	71,27	50,49
MO (% MS)	92,07	90,82	91,44
MOD (%)	71,08	64,76	46,16
EM (MJ/kgMS)	11,37	10,36	7,39

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FAD: fibra ácido detergente, FND: fibra neutro detergente, Dvivo: digestibilidad estimada *in vivo* de la materia orgánica, MO: materia orgánica, MOD: materia orgánica digestible, EM: energía metabolizable.

➤ Ensilados

En la tabla 14 se muestra el análisis químico de los diferentes ensilados. Según el forraje de partida se observa una diferencia entre los diferentes tipos de ensilados en

términos de MS. El ensilado del haba forrajera tiene un contenido más elevado que su intercultivo con el raigrás italiano y el raigrás italiano en monocultivo.

En concordancia con los resultados observados para los forrajes verdes en corte directo y los prehenificados durante 24 h, el ensilado del haba forrajera sigue manteniendo los mayores contenidos en proteína y carbohidratos estructurales (FND y FAD) y los menores aportes de MOD y energía metabolizable.

Tabla 14. Composición química de los ensilados de los forrajes ensayados

	Raigrás Italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba forrajera
pH	3,73	4,53	4,70
MS (%)	15,49	17,04	26,10
PB (% MS)	11,24	12,34	13,41
FND (% MS)	49,46	61,02	62,31
FAD (% MS)	30,06	43,80	48,77
Dvivo (%)	82,38	62,27	59,91
MO (% MS)	88,94	89,24	90,80
MOD (%)	73,29	55,55	54,39
EM (MJ/kgMS)	11,73	8,89	8,70

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FAD: fibra ácido detergente, FND: fibra neutro detergente, Dvivo: digestibilidad estimada *in vivo* de la materia orgánica, MO: materia orgánica, MOD: materia orgánica digestible, EM: energía metabolizable.

➤ Raciones completas mezcladas (TMR)

En la tabla 15 se presentan los valores nutritivos de las raciones completas mezcladas (TMR) según los diferentes ensilados de forrajes utilizados en su elaboración. Se observa que cualquiera que sea el tipo del forraje integrado en la dieta, las raciones no muestran diferencias al nivel proteína bruta (14,75 % MS: raigrás italiano; 15,39 % MS: haba+raigrás; 14,62 % MS: haba) ya que se formularon para ser isoprotéicas. Se observa también que el contenido protéico aumenta con el proceso de elaboración de la

mezcla como respuesta a la inclusión del resto de ingredientes (pienso mezcla y paja de cebada) especialmente en la TMR basada en ensilado de raigrás italiano.

Las cantidades de los diferentes ingredientes también se calcularon para obtener mezclas isoenergéticas (ver tabla 11), por lo que las diferencias en la fracción fibrosa con la incorporación del resto de ingredientes de la ración se han atenuado con el propósito de obtener un contenido energético similar en las 3 fracciones. Ahora bien, la mayor proporción de concentrado utilizada para elaborar la TMR con ensilado de raigrás italiano que, con un contenido inferior de PB que los otros ensilados, ha ocasionado un valor energético ligeramente más elevado con esta ración (10,03 vs. 9,33 MJ/kg MS por TMR con raigrás y con haba respectivamente).

Tabla 15. Composición química de las raciones completas mezcladas (TMR) según el ensilado de forraje incorporado en su elaboración

	Raigrás Italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba forrajera ³
MS (%)	29,87	30,61	35,07
PB (% MS)	14,75	15,40	14,63
FND (% MS)	41,81	47,55	48,94
FAD (% MS)	23,87	27,72	28,91
MO (% MS)	87,84	88,97	89,38
EE (% MS)	4,55	4,08	3,52
ALM (% MS)	13,44	12,60	10,63
EM (MJ/kgMS)	10,03	9,33	9,32

¹: Ración elaborada con ensilado de raigrás italiano de primer corte

²: Ración elaborada con intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: Ración elaborada con ensilado de haba forrajera

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FAD: fibra ácido detergente, FND: fibra neutro detergente, MO: materia orgánica, EE: extracto etéreo, ALM: almidón, EM: energía metabolizable.

5.2. Valores de proteína bruta, materia orgánica digestible y energía de los diferentes forrajes utilizados en el ensayo

➤ Proteína bruta

La tabla 16 presenta los resultados del contenido en proteína bruta (PB) de los forrajes verdes en corte directo, henificados durante un periodo de 24 horas, ensilados y de las correspondientes raciones completas mezcladas (TMR). Como se ha indicado anteriormente, el contenido en PB del monocultivo del haba es superior ($P < 0,05$) al del monocultivo de raigrás italiano (Raigrás) y al del intercultivo (Haba+Raigrás). Tras la prehenificación, esta diferencia se mantiene ($P < 0,01$). En los ensilados, el contenido en PB del haba sigue siendo más elevado en comparación con los otros. Además, se observa claramente un aumento del contenido en PB del ensilado de los tres forrajes con respecto al forraje verde en corte directo y el prehenificado. Se trata de un aumento pasivo como consecuencia de la concentración de nutrientes que se ocasiona por de la pérdida de efluentes y gases durante el proceso fermentativo. Tras la elaboración de las raciones completas mezcladas isoprotéicas, el contenido en PB de las tres dietas se igualó significativamente independientemente del ensilado integrado en la ración ($P > 0,05$).

Tabla 16. Contenido en proteína bruta (% MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas con raigrás italiano, haba forrajera e intercultivo de raigrás italiano y haba forrajera

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Forraje verde	8,50 ^{a A}	10,83 ^{ab A}	11,99 ^{b A}	1,135	*
Prehenificado	8,53 ^{a A}	10,02 ^{ab A}	12,58 ^{b AB}	1,008	**
Ensilado	11,24 ^{a A}	12,34 ^{ab AB}	13,41 ^{b AB}	0,561	**
Raciones completas mezcladas	14,75 ^B	15,40 ^B	14,63 ^B	0,946	NS
d.e.r. ³	0,855	0,8939	1,039		
P ⁴	***	***	*		

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadística NS: P> 0,05; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

➤ **Materia orgánica digestible**

En la tabla 17 se comparan los contenidos en materia orgánica digestible (MOD) de los forrajes verdes en corte directo, henificados durante un periodo de 24 horas y los ensilados. El contenido en MOD del monocultivo de raigrás en corte directo, prehenificado y su ensilado fue superior (P<0,05) al monocultivo del haba o asociada al raigrás.

Considerando el tipo de conservación, para el monocultivo de raigrás y el monocultivo del haba no hubo diferencias significativas durante la transición del forraje verde en corte directo al ensilado (P>0,05). Para el intercultivo del haba+raigrás el forraje verde en corte directo y el prehenificado tuvieron un mayor contenido de MOD en comparación con el ensilado.

Tabla 17. Contenido en materia orgánica digestible (% MO) en el forraje verde en corte directo, prehenificado y en el ensilado del raigrás italiano, haba forrajera e intercultivo de raigrás italiano y haba forrajera

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Forraje verde	75,52 ^c	67,10 ^{bB}	49,80 ^a	1,741	***
Prehenificado	71,08 ^b	64,76 ^{bB}	46,16 ^a	2,938	***
Ensilado	73,29 ^b	55,55 ^{aA}	54,39 ^a	3,338	***
d.e.r. ³	1,967	2,685	3,425		
P ⁴	NS	**	NS		

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadística NS: P> 0,05; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

➤ **Energía**

En la tabla 18, se muestran los resultados del contenido en energía metabolizable (EM) de los forrajes verdes en corte directo, henificados durante un periodo de 24 horas, ensilados y de las correspondientes raciones completas mezcladas, así como la energía neta de lactación (EN_L) de estas últimas. Considerando el tipo de forraje, hay diferencias significativas entre los tres forrajes (raigrás, haba+raigrás, haba) en todos los tipos de conservación. El monocultivo de raigrás en corte directo presentó el contenido más elevado en EM (12,08 MJ/kgMS) seguido por el intercultivo de raigrás con haba (10,7 MJ/kgMS), que es a su vez seguido por el monocultivo haba forrajera (7,39 MJ/kgMS).

En el haba forrajera en monocultivo y su intercultivo con raigrás, se observan diferencias significativas en el contenido de EM entre los forrajes verdes y prehenificados con sus correspondientes ensilados (P<0,05).

Según el tipo de conservación, el contenido en EM del raigrás en monocultivo disminuyó significativamente (P<0,05) desde el forraje verde en corte directo hasta la elaboración de raciones completas mezcladas.

Considerando la energía metabolizable, la ración completa mezclada del raigrás tiene 0,97 MJ/kg MS más que el haba en monocultivo o asociada al raigrás (P<0,01). Así, la energía neta de lactación del raigrás en monocultivo es superior de 0,12 Mcal/kg MS al haba forrajera en monocultivo o asociada al raigrás italiano. Sin embargo, esta diferencia de energía nutricional no tiene influencia en este tipo de animales.

Tabla 18. Contenido en energía metabolizable (MJ/kgMS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas y en energía neta de lactación de las raciones completas mezcladas (Mcal/kgMS) según tipo de forraje

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Forraje verde	12,08 ^c	10,7 ^b A	7,39 ^a A	0,464	***
Prehenificado	11,37 ^b B	10,36 ^b A	7,39 ^a A	0,471	***
Ensilado	11,73 ^b BC	8,89 ^a B	8,70 ^a B	0,532	***
Raciones completas mezcladas (EM)	10,03 ^b A	9,33 ^a B	9,32 ^a B	0,176	**
Raciones completas mezcladas (EN _L)	1,51 ^b	1,39 ^a	1,39 ^a	0,028	**
d.e.r. ³	0,261	0,362	0,493	0,059	
P ⁴	***	***	***		

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadística NS: P> 0,05; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

EM: energía metabolizable; EN_L: energía neta de lactación.

5.3. Contenido en fenoles totales de los forrajes y raciones completas mezcladas

En la Tabla 19 se presentan los resultados del contenido en fenoles totales de los forrajes verdes en corte directo, henificados durante un periodo de 24 horas, ensilados y de las correspondientes raciones completas mezcladas. El contenido en fenoles de la leguminosa tanto en monocultivo como en cultivo asociado con raigrás italiano es superior ($P < 0,001$) al del raigrás italiano. Tras la prehenificación y el ensilado de los forrajes, la concentración de fenoles totales disminuyó significativamente respecto a los contenidos observados en los forrajes en corte directo. Aún así, las diferencias entre el ensilado de raigrás italiano y los ensilados con leguminosa en monocultivo y leguminosa con raigrás se mantienen ($P < 0,01$). Ahora bien, cuando se elaboran las correspondientes raciones completas mezcladas, la concentración de fenoles se diluyen hasta no mostrar diferencias entre dietas en función del tipo de ensilado utilizado en la elaboración de la ración ($P > 0,05$).

Tabla 19. Contenido en fenoles totales (mg EAG/g MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas elaboradas con los ensilados de los diferentes forrajes

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Forraje verde	13,05 ^{aB}	33,44 ^{bC}	40,72 ^{bC}	3,263	***
Prehenificado	7,99 ^{aA}	17,45 ^{bB}	22,25 ^{cB}	1,048	***
Ensilado	10,24 ^{aAB}	17,74 ^{bB}	18,75 ^{bB}	1,844	**
Raciones completas mezcladas	6,87 ^A	8,05 ^A	9,73 ^A	1,235	NS
d.e.r. ³	1,473	1,989	2,103		
P ⁴	***	***	***		

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+ raigrás en proporción (60%-40%).

Fenoles totales en mg EAG/g MS: mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca.

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadística NS: $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

5.4. Contenido en taninos condensados de los forrajes y de las raciones completas mezcladas

En la Tabla 20 se presentan los resultados del contenido en taninos condensados de los mismos forrajes. El contenido de taninos condensados del haba en monocultivo tanto en corte directo como prehenificado es superior ($P < 0,05$) al del raigrás italiano. Tras el proceso fermentativo del ensilado, el contenido de taninos de los tres forrajes se iguala ($P > 0,05$), debido a un descenso significativo de la concentración de taninos concentrados en el haba. No se observaron diferencias significativas en las raciones completas mezcladas ($P > 0,05$) en cuanto a la concentración de taninos condensados. En dichas raciones completas mezcladas los contenidos en taninos condensados disminuyeron respecto a las cantidades presentes en los ensilados como consecuencia del efecto dilución con el resto de componentes que constituyen la ración.

Tabla 20. Contenido en taninos condensados (mg EC/g MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones completas mezcladas elaboradas con los ensilados de los diferentes forrajes

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Forraje verde	0,67 ^{aB}	0,86 ^{abB}	1,01 ^{bB}	0,106	*
Prehenificado	0,42 ^{aAB}	0,41 ^{aA}	0,82 ^{bB}	0,055	***
Ensilado	0,44 ^{AB}	0,450 ^A	0,39 ^A	0,184	NS
Raciones completas mezcladas	0,24 ^A	0,26 ^A	0,29 ^A	0,035	NS
d.e.r. ³	0,122	0,103	0,071		
P ⁴	**	***	***		

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

Taninos condensados en mg EC/g MS: mg de equivalentes de catequina por gramo de materia seca.

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación NS: $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

5.5. Efecto de componentes secundarios sobre la ingestión voluntaria

Según la tabla 21 no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dietas en el peso vivo inicial, final ni en la variación del peso vivo diario de las vacas ($p>0,05$).

El consumo de MS de pienso suplementario y de hierba fueron similares ($P>0,05$). Los valores de ingestión de materia seca de raciones completas mezcladas tampoco presentaron diferencia significativa entre las dietas (10,78 kg MS/d para el raigrás italiano, 10,24 kg MS/d para el ensilado del intercultivo haba y raigrás y 10,29 kg MS/d para el ensilado de haba, $P>0,05$). Como consecuencia, la ingestión total diaria de materia seca de las vacas, incluyendo el consumo de las raciones completas mezcladas, el pienso suplementario y el pasto fue similar entre tratamientos (26,67 kg MS/d para el raigrás italiano, 24,92 kg MS/d para el intercultivo raigrás+haba y 28,65 kg MS/d para el haba forrajera, $P>0,05$).

El consumo de fenoles totales provenientes de la TMR fue diferente entre las diferentes dietas ($P<0,001$), con un consumo mayor en la dieta elaborada con ensilado de haba: 98,93 g fenoles/día frente a los 73,45 g/d consumidos con la ración de raigrás italiano, mientras que la dieta con el ensilado de intercultivo presentó una ingesta de fenoles intermedia. Sin embargo, el consumo de taninos condensados fue similar entre dietas ($P>0,05$) con valores que oscilaron entre 2,56 - 2,88 g taninos condensados/día.

Tabla 21. Peso vivo corporal, consumo total de materia seca y consumo de fenoles y taninos provenientes de la TMR de las vacas durante el ensayo de alimentación según tipo de ensilado incluido en la formulación de la ración

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
PV _i (kg)	656	650	652	7,718	NS
PV _f (kg)	658	655	660	8,965	NS
Var PV (kg/día)	0,38	0,88	1,25	0,858	NS
TMR (kg MS/día/vaca)	10,78	10,24	10,29	0,972	NS
Pienso (kg MS/día/vaca)	4,29	4,14	4,10	0,264	NS
Hierba (kg MS/día/vaca)	11,60	10,54	14,26	3,763	NS
Total (kg MS/día/vaca)	26,67	24,92	28,65	3,624	NS
Fenoles (g/día)	73,45 ^a	82,16 ^{ab}	98,83 ^b	8,131	***
Taninos (g/día)	2,56	2,61	2,88	0,249	NS

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadístico NS: P> 0,05; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

PV_i: peso vivo inicial; PV_f: peso vivo final; Var PV: variación de peso vivo; MSI: materia seca ingerida.

5.6. Efecto de componentes secundarios sobre las producciones

La tabla 22 presenta los resultados de producción y composición de la leche. La producción de leche de las vacas difirió entre los tratamientos (34,42 kg/día para la ración de raigrás, 32,81 kg/día para la ración de haba+raigrás y 32,11 kg/día para la ración de haba, (P<0,001). En cuanto a la composición de la leche, no hubo diferencias significativas (P>0,05) entre tratamientos, para los contenidos en lactosa, extracto seco magro y tampoco para los recuentos de células somáticas. Sin embargo, el efecto tratamiento influyó sobre el contenido de grasa y proteína de la leche (P<0,001), obteniéndose las mayores concentraciones en el tratamiento de haba con un valor de 32,9 g/kg para la proteína y 37,1 g/kg para la grasa. El contenido de urea también fue

diferente significativamente ($P < 0,001$) entre dietas (212,57 mg/L para el raigrás, 271,12 mg/L para el haba+raigrás y 348,38 mg/L para el haba).

Tras el cálculo de producción de leche corregida al 4 % de grasa y la producción de leche corregida por energía no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$). Como el raigrás produce más volumen de leche y el haba induce a mayores contenidos en proteína y grasa, la producción de grasa total del raigrás (1187 g/día) es similar a la del haba forrajera (1191 g/día) y ocurre lo mismo para la proteína (1053 g/día para el raigrás y 1056 g/día para el haba). El contenido de grasa y proteína del intercultivo de haba+raigrás fue menor en comparación con ambos monocultivos (1151 g/día para la grasa y 987 para la proteína).

Tabla 22. Producción y composición de la leche de las vacas del ensayo de alimentación

	Raigrás italiano ¹	Haba+Raigrás ²	Haba	d.e.r. ³	P ⁴
Producción de leche (kg/día)	34,42 ^b	32,81 ^a	32,11 ^a	1,720	***
LCG (kg/día)	31,63	30,61	30,67	2,041	NS
LCE (kg/día)	31,60	30,38	30,71	2,002	NS
Grasa (g/kg)	34,50 ^a	35,10 ^a	37,10 ^b	3,128	***
Proteína (g/kg)	30,60 ^a	30,10 ^a	32,90 ^b	1,645	***
Lactosa (g/kg)	47,40	4,76	47,20	1,794	NS
ESM (g/kg)	85,20	84,60	85,80	2,862	NS
Células (célulasx1000/mL)	73,36	82,30	96,27	52,12	NS
Urea (mg/L)	212,57 ^a	271,12 ^b	348,38 ^c	10,259	***

¹: Raigrás italiano de primer corte.

²: Intercultivo haba+raigrás en proporción (60%-40%).

³: desviación estándar residual. ⁴: Significación estadística NS: $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

LCG: leche corregida por grasa; LCE: leche corregida por energía; ESM: extracto seco magro.

DISCUSIÓN

6. Discusión

6.1. Valor nutritivo de los forrajes

En términos de calidad nutritiva, no hubo diferencias significativas entre los contenidos en MS del haba forrajera y el raigrás italiano en corte directo cosechados ambos en el estado fenológico considerado como óptimo para obtener la mejor combinación entre rendimiento (kg MS/ha) y calidad nutritiva, lo cual es coherente con los resultados de Martínez-Fernández et al. (2005). El haba se cosechó en el estado fenológico de vainas con grano y el raigrás al principio del espigado.

El haba forrajera en monocultivo o asociada al raigrás italiano presentó mayor aporte protéico en comparación con el raigrás italiano en monocultivo en todos los estados de conservación ($P < 0,05$). Estos resultados son coherentes con lo esperado ya que las leguminosas se caracterizan por ser una fuente de proteína vegetal y corroboran los resultados obtenidos por Baizán et al. (2015) en la misma zona geográfica y con los mismos cultivos invernales. También están en concordancia con los resultados de Copani (2015) y Baumont et al. (2016) que afirman, en sus respectivos trabajos, que las leguminosas tienen mayor contenido en proteína que las gramíneas. Cabe destacar que el contenido en proteína bruta del haba forrajera en monocultivo obtenido en este trabajo fue menor que el encontrado por Borreani et al. (2009) tanto en corte directo (12 % vs. 19,7 % PB sobre MS) como prehenificado (12,6 % vs. 21,0 % PB sobre MS). Sin embargo, el contenido en PB del haba en este estudio fue similar al encontrado por de la Roza et al. (2004) en la misma zona de influencia climatológica.

Con respecto a la fibra, el haba forrajera presentó contenidos en FND y FAD elevados en comparación con los valores obtenidos por Borreani et al. (2009). Las diferencias en este caso pueden estar relacionadas con el estado fenológico en el momento de la cosecha. En nuestro caso, para obtener buenos rendimientos en kg MS/ha, las habas se cosecharon cuando la vaina ya estaba formada con grano semimaduro. Para ello, el cultivo tuvo que alcanzar gran envergadura, con alturas próximas al 1,5 m, lo que significa que para mantenerse erguido necesita un elevado contenido en carbohidratos estructurales.

En cuanto a los aportes de materia orgánica digestible y energía con los resultados obtenidos en este estudio, solamente el intercultivo de haba y raigrás puede plantearse

como alternativa viable al monocultivo de raigrás ($P < 0,05$), lo que está en concordancia con los resultados obtenidos por Baizán et al. (2015).

En general la calidad nutritiva del ensilado de haba forrajera fue similar a lo encontrada por Martínez-Fernández et al. (2016) con este mismo cultivo, pero inferior a la del ensilado de otras leguminosas como el guisante (*Pisum sativum* L., Martínez-Fernández et al., 2016) o el trébol pata de pájaro (*Lotus corniculatus* L., Broderick et al., 2017).

6.2. Contenido en compuestos secundarios

El contenido en fenoles totales y taninos condensados del haba forrajera en corte directo en monocultivo o asociada con raigrás fue superior al del monocultivo del raigrás italiano ($P < 0,05$). Tras la prehenificación, este contenido disminuyó hasta la mitad probablemente como consecuencia de la pérdida de las hojas durante el prehenificado. Las hojas son el lugar de la planta donde se concentra la mayor proporción de componentes secundarios (Aufreere et al. 2013). La disminución en el contenido en taninos condensados durante el prehenificado fue mayor en el haba forrajera que en el raigrás italiano ($P < 0,05$).

En el ensilado del haba forrajera en monocultivo o asociada con el raigrás italiano, el contenido en estos compuestos secundarios disminuyó probablemente como consecuencia de una liberación parcial de estos compuestos al romperse las paredes vegetales durante el proceso de fermentación. Aún así siguió siendo más elevado que el de raigrás italiano.

Estos resultados son diferentes a los encontrados por Copani (2015), cuando analizó el contenido en compuestos secundarios en la esparceta y no encontró diferencias significativas entre contenidos en taninos condensados del forraje verde, prehenificado y ensilado.

A pesar de las diferencias encontradas entre los diferentes forrajes, la incorporación de los nuevos ingredientes en la elaboración de las mezclas unifeed, diluyó las diferencias hasta el punto de no encontrar diferencias significativas entre las tres raciones con respecto al contenido de fenoles totales ni de taninos condensados ($P > 0,05$).

Si nos fijamos en los contenidos de taninos condensados obtenidos en la leguminosa ensayada en este trabajo (1,01 g/kg MS), cabe destacar que el haba forrajera presentó un menor contenido de estos compuestos en comparación con lo referenciado en la

Feedipedia (2016). En esta enciclopedia on-line para la alimentación animal creada conjuntamente por el Insitituto Nacional de Investigación francés (INRA), el Centro francés de investigación agronómica para el desarrollo (CIRAD), la Asociación francesa de zootecnia (AFZ) y el Sistema de información de recursos para alimentación animal de la FAO, indican que el contenido de taninos condensados para el mismo cultivo está en el orden de 4,8 g/kg MS.

Comparando con otras leguminosas, el haba forrajera en corte directo presentó un contenido menor en taninos condensados (1,01 g/kg MS) que la esparceta verde (*Onobrychis viciifolia* Scop.) en el estudio de Copani (2015) (35 g/kg MS), el lotus grande (*Lotus grandiflorus* Benth.) en el estudio de Terril et al. (1992) (50-77 g/kg MS) y el trébol pata de pájaro en el estudio de Broderick et al. (2017) (11,6 g/kg MS).

6.3. Ingestión voluntaria de las vacas

La ingestión diaria de materia seca de las raciones completas mezcladas fue similar entre las diferentes dietas (raigrás, haba+raigrás, haba) que presentaban similares contenidos en fenoles totales y en taninos condensados. Por lo tanto, el consumo de materia seca de las vacas no se vió afectado por la inclusión del ensilado del haba forrajera en las raciones completas mezcladas, ya que a pesar de partir de contenidos más elevados en compuestos secundarios en el momento de la cosecha, el contenido en taninos condensados en la ración se diluyó hasta encontrarse muy por debajo del valor limitante de ingestión indicado por Aufrere et al. (2013).

Estos resultados de ingestión son similares a los encontrados por Baizán et al. (2017) con dietas y animales similares. Sin embargo, Jiménez-Calderón et al. (2014) y Jiménez-Calderón (2017) comparando raciones formuladas con ensilado de raigrás italiano frente de un cultivo asociado de haba y colza, obtuvieron ingestiones significativamente menores con la ración que incluía la leguminosa. Esto nos induce a pensar que el efecto depresivo sobre la ingestión pudo ser debido a los glucosinolatos de la colza que, según Pailau y Singhal (2007), pueden afectar la palatabilidad de la dieta y reducir el consumo en vez ser debido a la presencia del haba forrajera en la ración.

La ingestión total de MS, incluyendo TMR, pienso suplementario y hierba, no presentó diferencias significativas entre tratamientos, lo cual concuerda con los resultados

encontrados por Baizán et al. (2017) con los mismos cultivos y condiciones semejantes del presente ensayo. Esto nos induce a pensar que la presencia del haba forrajera en la ración no altera el consumo negativamente y puede considerarse como una alternativa viable al cultivo invernal de raigrás italiano para ser utilizada en la alimentación del vacuno lechero.

Ahora bien, los resultados obtenidos con otras leguminosas no van en el mismo sentido. Por ejemplo, Broderick et al. (2017) encontraron que la ingestión de las vacas alimentadas con raciones completas mezcladas en las que se integró el ensilado de trébol pata de pájaro con un contenido en taninos condensados muy superior a lo encontrado en el haba (11,6 g/kg MS), aumentó entre 1,3 y 2,8 kg MS/día en comparación con dietas a base del ensilado de alfalfa que, según Barry y McNabb (1999), tiene menor contenidos en taninos condensados que el trébol pata de pájaro (0,5 g/kg MS).

6.4. Producción y composición de leche

La producción de leche fue menor en el tratamiento que incluía ensilado de haba forrajera, con una concentración de taninos condensados en el forraje verde superior a la del raigrás italiano (1,01 g/kg MS vs. 0,67 g/kg MS para el haba y el raigrás respectivamente). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Broderick et al. (2017) cuando compararon el efecto de dos leguminosas con diferente contenido en taninos condensados, encontrando que a mayor contenido en taninos condensados la producción de leche era menor (1,57 kg de leche/kg MSI vs. 1,65 kg de leche/kg MSI para las dietas a base de ensilado de trébol pata de pájaro y alfalfa respectivamente). Sin embargo, Brunschwig et al. (2004), no encontraron ningún efecto depresivo sobre la producción de leche al sustituir la harina de colza de la ración por haba forrajera en dietas isoenergéticas e isoproteicas. Por el contrario, en el estudio de Min et al. (2003), las vacas alimentadas con leguminosas con contenidos moderados en taninos condensados (20-45 g/kg MS), como la zulla (*Hedysarum coronarium* L.) y trébol pata de pájaro, aumentaron su producción láctea. Estos efectos, aparentemente contradictorios, han sido observados por otros autores cuando a ovejas en lactación les han incluido un 2 % (Toral et al., 2013) y un 5,3 % (Buccioni et al., 2015) de quebracho (*Schinopsis balansae* Engl.) en la ración. Ello podría ser dependiente de la semana de

lactación. Así, Wang et al. (1996) observaron que la inclusión de trébol pata de pájaro en la dieta de ovejas inducía a un descenso en la producción de leche hasta la quinta semana de lactación pero aumentó entre las semanas sexta y undécima.

Sin embargo, la producción de proteína y grasa en leche fue mayor en el tratamiento con leguminosa ($P < 0,001$). Estos resultados de grasa son parecidos al estudio de McKnight y MacLeod (1977) con el ensilado de haba forrajera (4,09 %) frente al ensilado de hierba (3,77 %). Sin embargo, Melicharová et al. (2009) no encontraron efectos significativos sobre la producción de leche ni sobre sus componentes individuales al añadir haba a la mezcla de dietas.

La dieta a base del ensilado de haba forrajera indujo un mayor contenido en urea en comparación con las dietas con ensilado de raigrás y ensilado de haba+raigrás, aunque todos los valores encontrados se sitúan siempre dentro del rango óptimo (210-320 mg urea/L) establecido por Salcedo-Díaz y Villar-Bonet (2015). Los resultados son concordantes con los obtenidos por Baizán et al. (2017) para las mismas raciones. Jiménez-Calderón (2017) también observó mayor excreción de urea en leche en raciones elaboradas con un intercultivo de haba+colza. El nivel de urea en leche es un reflejo del consumo de proteína dietética (Wittwer et al., 1999), y puede ser atribuido a un exceso de proteína en la dieta o a una ineficiente utilización de la misma (Vicente, 2002) aun cuando el contenido en proteína en leche fue superior con la ración con haba forrajera. Factores como la relación proteína/energía de la dieta o la relación proteína no degradable/degradable en el rumen pueden afectar al contenido de urea en leche (Baker et al., 1995). Si el aporte de energía con la dieta con haba forrajera fue el adecuado, lo que se refleja en su mayor concentración de proteína en la leche, también se esperaría una excreción de urea menor. Por ello, la mayor excreción de urea con dicha dieta puede estar relacionado con el mayor contenido en N amoniacal en el ensilado de haba forrajera en monocultivo que en el ensilado de raigrás italiano en monocultivo o asociado con otras especies o incluso mayor que el observado en el ensilado de otras leguminosas como los guisantes (Martínez Fernández et al., 2016). Esto incrementaría la síntesis de urea en el hígado y finalmente la excreción de urea en leche.

CONCLUSIONES Y SÍNTESIS FINAL

7. Conclusiones y síntesis final

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo en el que se evaluó el efecto sobre la ingestión voluntaria del contenido en componentes secundarios (fenoles totales y taninos condensados) del ensilado del haba forrajera integrado en raciones completas mezcladas destinadas a la alimentación de vacuno lechero se puede concluir que:

1. Los contenidos en fenoles totales y taninos condensados en el monocultivo del haba forrajera en corte directo o asociado con raigrás son superiores al de raigrás italiano en monocultivo. Sin embargo, estos compuestos secundarios disminuyen significativamente durante los procesos de prehenificado y ensilado hasta igualar su concentración con el ensilado de raigrás italiano, por lo que el ensilado de haba forrajera puede ser una alternativa viable al ensilado de raigrás italiano con respecto a los componentes secundarios.
2. La inclusión del ensilado del haba forrajera en las dietas del vacuno lechero no afecta negativamente a la ingestión voluntaria debido tanto al descenso observado en componentes secundarios durante el proceso de ensilado como al efecto de dilución que se produce en el contenido final de componentes al integrar otros componentes en la ración.
3. La inclusión del ensilado de haba forrajera en raciones de vacuno lechero disminuyó la producción diaria de leche, pero mejoró su composición en grasa y proteína en comparación con la producción de las vacas alimentadas de raciones a base del ensilado de raigrás italiano igualando la excreción diaria por vaca de grasa y proteína.
4. El haba forrajera es una buena alternativa al raigrás italiano para rotar con el maíz forrajero en un sistema de rotación de dos cultivos anuales destinados a la alimentación del vacuno lechero, ya que disminuye el coste de la ración al requerir una menor proporción de concentrado en la ración, sin deprimir la ingestión ni la producción diaria de grasa y proteína en leche.

Síntesis final

La integración del ensilado de haba forrajera en las raciones completas mezcladas destinadas a la alimentación de vacuno lechero no afectó negativamente la ingestión voluntaria de materia seca por las vacas, ya que su contenido en componentes secundarios disminuyó por debajo de las cantidades consideradas como limitantes durante el proceso de prehenificación y ensilado y posteriormente sufrió un efecto dilución al integrar otros componentes en la ración.

En cuanto a la producción y la calidad de leche, las vacas alimentadas con raciones a base del ensilado del haba forrajera disminuyeron su producción pero mejoraron su composición en grasa y proteína en comparación con las alimentadas con raciones de raigrás italiano. Sería interesante ver si además de incrementar el porcentaje de grasa en leche la inclusión de esta leguminosa afecta también la composición de esta grasa como consecuencia de la modificación del metabolismo lipídico en el rumen.

Por otra parte parece conveniente ampliar el presente estudio a otras leguminosas aptas para su cultivo en las condiciones de suelo y clima de la Cornisa Cantábrica, que pueden ser alternativas viables al raigrás italiano pero más sostenibles que éste, tanto desde el punto de vista económica (mayor suficiencia proteica) como ambiental (menor necesidad de fertilización) y que, además, no alteren la ingestión voluntaria, con una mejora de la producción y la composición de leche, estudiando, asimismo, el efecto de las moléculas bioactivas sobre la insaturación de la grasa de leche a través su perfil en ácidos grasos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- ADAS. (1985). Compound feed evaluation for the ruminants. Technical Bulletin 85/21. Ministry of Agricultural, Fisheries and Food, pp. 2. Reading, (UK).
- Adler, S.A., Purup, S., Hansen-Møller, J., Thuen, E., Gustavsson, A.M. and Steinshamn, H. (2014). Phytoestrogens and their metabolites in milk produced on two pastures with different botanical composition. *Livestock Science*, 163: 62-68.
- 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.
- AFRC. (1993). Energy and protein requirements of ruminants. *Agricultural and Food Research Council*. CAB International. Wallingford, (UK).
- Alibes, X. and Tisserand, J.L. (1990). Tables of the nutritive value for ruminants of Mediterranean forages and by-products. *Options Méditerranéennes: Série B, Etudes et recherches* 4. CIHEAM, pp. 152.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C., Canul-Ku, H.L. and Hoste, H. (2009). Intake of tropical tanniniferous plants by goats and sheep when offered as a sole fed. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11: 255-258.
- AOAC. (1984). Official methods of analysis. *Association of Official Agriculture Chemist*, 14th Edition, pp. 1141, (E.E.U.U).
- ARC. (1980). The nutrient requirements of ruminant livestock. *Agriculture Research Council*. Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 351, (UK).
- Arrigo, Y. and Dohme, F. (2009). Sainfoin *versus* alfalfa as supplements for grazing cows. *Suisse Agriculture*, 41: 283–288.
- Aufrère, J., Dudilieu, M, Poncet, C. and Baumont, R. (2013). Mixing sainfoin and lucerne to improve the feed value of legumes fed to sheep by the effect of condensed tannins. *Animal*, 7: 82-92.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 2: 119-145.
- Bach, A., Iglesias, C. and Busto, I. (2004). Technical note: A computerized system for monitoring feeding behavior and individual feed intake of Dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87: 4207-4209.

- Bae, H.D., McAllister, T.A., Yanke, J., Cheng, K.J. and Muir, A.D. (1993). Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2132–2138.
- Baizán, S., Martínez-Fernández, A. y Vicente, F. (2017). XVII Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza, (España).
- Baizán, S., Vicente, F., González, M.A., González García, C., de la Roza Delgado, B., Soldado Cabezuelo, A. y Martínez- Fernández, A. (2015). Alternativas forrajeras sostenibles como cultivo e zonas templadas. *Pastos*, 45 (2): 23-32.
- Baker, L.D., Ferguson, J.D. and Chalupa, W. (1995). Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78: 2424-2434.
- 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.
- Baumont, R., Bastien, D., Féraud, A., Maxin, G. and Niderkorn, G. (2016). Les intérêts multiples des légumineuses fourragères pour l'alimentation des ruminants. En: Les légumineuses fourragères et prairiales, pp. 121-134. Journées AFPP. Paris, (France).
- Baumont, R., Dulphy, J.P., Sauvant, D., Meschy, F., Aufrere, J. and Peyraud, J.L. (2007). Valeur nutritive des fourrages et des matières premières: tables et prévision. En: Alimentation des bovins, ovins et caprins, Tables INRA, pp. 149-179.
- Becker, P.M., Meulen, J.V., Jansman, A.J.M. and Wikselaar P.G.van. (2012). *In vitro* inhibition of ETEC K88 adhesion by pea hulls and of LT enterotoxin binding by faba bean hulls. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96: 1121-1126.
- Benchaar, C. and Chouinardt, P.Y. (2009). Short communication: Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 3392-3396.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92: 5512–5522.

- Borreani, G., Revello Chion, A., Colombini, S., Odoardi, M., Paoletti, R. and Tabacco, E. (2009). Fermentative profiles of field pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and white lupin (*Lupinus albus*) silages as affected by wilting and inoculation. *Animal Feed Science and Technology*, 151: 316–323.
- Broderick, G.A., Grabber, J.H., Muck, R.E. and Hymes-Fecht, UC. (2017). Replacing alfalfa silage with tannin-containing birdsfoot trefoil silage in total mixed rations for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100: 1–15, in press. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12073>
- Brunschwig, P. and Lamy, J.M. (2003). High-protein crops contribute to the feed self-sufficiency of dairy herds without any adverse effect on the performances (Les protéagineux contribuent à l'autonomie alimentaire du troupeau laitier alimenté avec du maïs ensilage, sans pénaliser les performances). *Fourrages*, 175: 395-402.
- Brunschwig, P., Lamy, J.M., Peyronnet, C. and Crépon, K. (2004). Faba bean valorisation in complete diet for dairy cows. En: Rencontres autour des recherches sur les ruminants, 11^{ème} journées. (France).
- 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 of Dairy Science*, 98: 1145-1156.
- Buccioni, A., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., Minieri, S., Conte, G. and Mele, M. (2010). Conjugated linoleic acid (CLA) and C18:1 isomers content in milk fat of sheep and their transfer to Pecorino Toscano D.O.P. cheese. *International Dairy Journal*, 20: 190–194.
- Bulter, L.G. (1992). Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects. En: Proceeding of the 16th International Conference of Groupe polyphenols V (16), part II, pp. 11-18. (France).
- Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A. and Frutos, P. (2015). Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate in vitro ruminal biohydrogenation in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 202: 42-51.
- Copani, G. (2015). Benefit of including bioactive legumes (sainfoin, red clover) in grass-based silages on ruminant production and pollutant emissions. Ph.D

- Thesis, Ecole doctorale sciences de la vie, sante, agronomie, environnement, (France).
- Copani, G., Nidrkorn, V., Anglard, F., Quereuil, A. and Ginane, C. (2016). Silages containing bioactive forage legumes: a promising protein-rich food source for growing lambs. *Grass and Forage Science*, in press. DOI: 10.1111/gfs.12225.
- Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P. and Duc, G. (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115: 329-339.
- de la Roza, B., Martínez-Fernández, A. y Argentería, A. (2002). Determinación de materia seca en pastos y forrajes. Temperatura de secado para análisis. *Pastos*, XXXII(1): 91-104.
- de la Roza, B., Martínez-Fernández, A., Soldado, A. y Argentería, A. (2004). Evolución de la producción y ensilabilidad de la asociación triticale-haboncilos, según estado de desarrollo. En: García B. et al. (Eds). *Pastos y ganadería extensiva*, pp. 273-278. Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Salamanca, (España).
- Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F. and Scollan, N.D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131: 168-206.
- 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.
- FAO/IAEA. (2000). Quantification of tannins in tree foliage. Working document IAEA. Vienna, (Italy).
- Feedipedia (2016). Available at: <http://www.feedipedia.org/node/4926> (10/10/2016).
- Fraser, M., Fychan, R. and Jones, R. (2001). The effect of harvest date and inoculation on the yield, fermentation characteristic and feeding value of forage pea and field bean silages. *Grass Forage Science*, 56: 218–230.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Fernández, M. and Mantecón, A. (2000). Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meal in sheep. *Journal of Agriculture Science*, 134: 101-108.

- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. and Mantecón, A.R. (2004). 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 Agriculture Research*, 55: 1125-1132.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. and Mantecón, A.R. (2004). Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agriculture Research*, 2: 191-202.
- Frutos, P., Moreno-Gonzalo, J., Hervás, G., García, U., Ferreira, L.M.M., Celaya, R., Toral, P.G., Ortega-Mora, L.M., Ferre, I. and Osoro, K. (2008). Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal*, 2: 1449-1456.
- Gaines, W.L. (1928). The energy basis of measuring milk yield in dairy cows. En: Illinois Agriculture Experimental Station Annual Report, pp. 308.
- Girard, M., Dohme-Meier, F., Silacci, P., AmpueroKragten, 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.
- 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.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. and Waghorn, G.C. (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.
- Hagerman, A.E. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal Chemical Ecology*, 13:437-449.
- Hatew, B., Stringano, E., Mueller-harvey, I., Hendriks, W.H., Carbonero, C.H., Smith, L.M.J. and Pellikaan, W.F. (2015). Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on in vitroruminal methane production and fermentation characteristics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, in press. DOI: 10.1111/jpn.12336.
- He, M.L., McAllister, T.A., Kastelic, J.P., Mir, P.S., Aalhus, J.L., Dugan, M.E.R., Aldai, N. and Mckinnon, J.J. (2012). Feeding flaxseed in grass hay and barley

- silage diets to beef cows increases alpha-linolenic acid and its biohydrogenation intermediates in subcutaneous fat. *Journal of Animal Science*, 90: 592-604.
- Hervás, G. (2001). Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas; efecto sobre la fermentación en el rumen la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis doctoral, Universidad de León, (España).
- Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Almar, M.M. and Frutos, P. (2003). Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology*, 129: 44-54.
- 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.
- Jiménez-Calderón, J.D. (2017). Producción sostenible de leche de vaca mediante pastoreo y cultivos forrajeros obtenidos con fertilización orgánica. Ph.D Thesis, Universidad de Zaragoza, (España).
- Jiménez-Calderón, J.D., Martínez-Fernández, A., Soldado, A., González, A., de la Roza-Delgado, B. y Vicente, F. (2014). XIX Congreso Internacional ANEMBE. Oviedo, (España).
- Khanbabae, K. and van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18: 641–649.
- Liao, X., Ma, H., Wang, Ru. and Shi Bi. (2004). Adsorption of UO_2^{2+} on tannins immobilized collagen fiber membrane. *Journal of Membrane Science*, 243: 235–241.
- Lombardi, D., Vasseur, E., Berthiaume, R., DeVries, T.J. and Bergeron, R. (2015). Feeding preferences and voluntary feed intake of dairy cows: Effect of conservation and harvest time of birdsfoot trefoil and chicory. *Journal of Dairy Science*, 98: 7238–7247.
- Louw, A.W. (2009). The nutritive value of faba bean silage for lactating dairy cows. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Agriculture (Animal Sciences), Stellenbosch University, (South Africa).
- MacAdam, J.W. and Villalba, J.J. (2015). Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. *Agriculture*, 5: 475-491.

- Macon, B., Sollenberger, L.E., Moore, J.E., Staples, C.R., Fike, J.H. and Portier, K.M. (2003). Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *Journal Animal Science*, 81: 2357-2366.
- MAFF. (1984). Energy allowances and feeding systems for ruminants. Reference Book 433. *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*, London, (UK).
- Makkar, H.P.S. (2003). 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: 241-56.
- Makkar, H.P.S. and Beever, D. (2013). Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems. FAO Animal Production and Health Proceedings 16. Rome, FAO and Asian-Australasian Association of Animal Production Societies.
- Mangan, J.L. (1988). Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1: 209–231.
- Martín-Pedrosa, M., Varela, A., Guillamon, E., Cabellos, B., Burbano, C., Gomez-Fernandez, J., De Mercado, E., Gomez-Izquierdo, E., Cuadrado, C. and Muzquiz, M. (2016). Biochemical characterization of legume seeds as ingredients in animal feed. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14, pp. 14. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016141-7450>.
- Martínez, T.F., Moyano, F.J., Diaz, M., Barroso, F.G. and Alarcón, F.J. (2004). Ruminal degradation of tannin-treated legume meals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1979-1987.
- Martínez-Fernández, A., Benaouda, M., Próspero, F. y Vicente, F. (2013). Comportamiento agronómico de la asociación forrajera haba-colza como alternativa invernal sostenible al raigrás italiano. En: Olea, L. et al (eds) Los pastos: Nuevos retos, nuevas oportunidades. Olea, L. et al. (eds). Actas de la 52 RC de la SEEP. pp. 219-226. Badajoz, (España).
- Martínez-Fernández, A., de la Roza Delgado, B., Soldado Cabezuelo, A. y Argamentería Gutiérrez, A. (2005). Evaluación de producción y valor nutritivo de las habas forrajeras como alternativa al raigrás italiano utilizadas como cultivo de invierno en rotación con el maíz. En: B.de la Roza et al (Eds). Producciones agroganaderas gestión eficiente y conservación del medio natural. Actas de la XLVR. RC. de la SEEP, V (2): 681-688.
- Martínez-Fernández, A., Soldado, A., de la Roza, B., Vicente, F., González, M.A. and Argamentería, A. (2013 b). Modeling a quantitative ensilability index adapted to

- forages from wet temperate areas. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11:455-462.
- Martínez-Fernández, A., Argamentería, A. and de la Roza, B. (2014). Manejo de forrajes para ensilar. Ed: SERIDA. Villaviciosa, (España). 280 pp.
- Martínez-Fernández, A., Soldado, A., Vicente, F, Martínez, A. and de la Roza Delgado, B. (2010). Wilting and inoculation of *Lactobacillus buchneri* on intercropped triticale fava silage: effects on nutritive fermentative and aerobic stability characteristics. *Agriculture and Food Science*, 19: 302-312.
- Martínez-Fernández, A., Vicente, F., de la Roza Delgado, B. y Argamentería, A. (2008). Ensilado de haboncillos en monocultivo o asociado a triticale. *Pastos XXXVIII (I)*: 75-90.
- Martínez-Fernández, A., Vicente, F., de la Roza Delgado, B., Soldado, A., García, J., Alonso, J.M. y Peláez, M. (2016). Importancia del uso de aditivos en la calidad y estabilidad de los ensilados de leguminosas. En: Báez, M.D. et al. (eds). Innovación sostenible en pastos: Hacia una agricultura de respuesta al cambio climático. 55 Reunión Científica de la sociedad española para el estudio de los pastos. pp: 87-92. Lugo, (España).
- Matthews, P. and Marcellos, H. (2003). Faba bean. New South Wales, Department of Primary Industry, Division of Plant Industry, *AgFact*, 2: 2.4.7. Available at: http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0004/157729/faba-bean-pt1.pdf
- McKnight, D.R. and MacLeod, G.K. (1977). Value of whole plant faba bean silage as sole forage for lactating cows. *Canadian Journal Animal Science*, 57: 601-603.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. and Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93.
- McVicar, R., Panchuk, D., Brenzil, C., Hartley, S., Pearse, P. and Vandenberg, A. (2013). Faba bean. Government Saskatchewan, Agriculture, Crops. (Canada).
- Melicharová, V., Pechová, A., Dvořák, R. and Pavlata, L. (2009). Performance and metabolism of dairy cows fed bean seeds (*Vicia faba*) with Different Levels of anti-nutritional substances. *Acta Veterinaria Brunensis*, 78: 57-66.

- Métivier. (2014). Féverole et vesce pour récolter un mélange mieux doté en protéines. Agricultures et Territoires, Chambre d'Agriculture. Normandie, (France).
- Mijangos, I., Vicente, F., Modroño, S., Anza, M., Garbisu, C. y Martínez-Fernández, A. (2015). Diagnóstico comparativo de la salud agroecosistémica bajo diferentes sistemas de abonado para el cultivo de maíz. En: Pastos y forrajes en el siglo XXI. 54ª Reunión científica de la SEEP. pp. 217-224.
- 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.
- Min, B. and Hart, S. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, 81: 102-109.
- Molan, A.L., Ahwood, G.T., Min, B.R. and McNabb, W.C. (2001). The effect of condensed tannin from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 623-633.
- Molina Alcaíde, E. (2016). Las leguminosas en nutrición de ruminates. XXVIII Foro de Colaboración Público-Privada « Leguminosas. Producción y consumo. Una revolución pendiente: http://www.ub.edu/campusalimentacio/ca/documents/Foro_INIA_leguminosas.pdf.
- Morales-Almaráz, E., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., Domínguez-Vara, I., de la Roza Delgado, B. and Vicente, F. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding on total mixed ration. *Journal of Dairy Research*, 77: 225-230.
- Muehlbauer, F. and Tullu, A. (1997). *Vicia faba* L. En: New Crop Factsheet, Purdue University, Center new crops and plants products. Available at: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/fababean.html>
- 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. and McAllan, A. (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology*, 1: 151-217.

- NRC. (1988). Nutrient requirements of dairy cattle. *National Research Council*. University of Florida, IFAS extention.
- NRC. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. *National Research Council*. En: Seventh Revised Edition. Washington, (E.E.U.U).
- Otero, M. y López, C. (2015). La nueva PAC ya está aquí. Ayudas directas para la ganadería de vacuno. *Campoastur*, 9: 16-20.
- Otero, M.J. and Hidalgo, L.G. (2004). Condensed tannins in temperate forage species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). *Livestock Research for Rural Development*, 16. DOI: <http://www.lrrd.org/lrrd16/2/oter1602.html>
- Pailan, G.H. and Singhal, K.K. (2007). Effect of dietary glucosinolates on nutrient utilización, milk yield and blood constituents of lactating goals. *Small Ruminant Research*, 71: 31-37.
- Patra, K. and Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminal nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 24-37.
- Peyraud, J.L., Dourmad, J.Y., Lessire, M., Medale, F. and Peyronnet, C. (2015). Conséquences zootechniques de l'introduction des légumineuses françaises dans les systèmes de production animale. En: Les légumineuses pour des systèmes alimentaires et agricoles durables. Schneider A. et Huyghe C. (Eds.), Quae Editions, pp. 225-262, (France).
- Piñeiro, J., Díaz, N., Santoalla, M.C., Suárez, R. y Fernández, J. (2004). Variedades de guisante para forraje. Siembras de otoño. En: Pastos y Ganadería Extensiva. B. García Criado et al. (Eds), pp. 405-409. Actas de la XLIV RC de la SEEP. Salamanca, (España).
- Porter, L.J., Hirstich, L.N. and Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25: 223–230.
- Provenza, F.D. and Villalba, J.J. (2010). The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Research*, 89: 131-139.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing.

- Resch, C., Bande-Castro, M.J., Pereira-Crespo, S., Fernández-Lorenzo, B. y Flores, G. (2013). Evaluación de variedades comerciales de sorgo forrajero en siembras tardías en la Galicia atlántica: I. Rendimiento en materia seca. En: Olea, L. et al (eds) Los pastos: Nuevos retos, nuevas oportunidades. Olea, L. et al. (eds). Actas de la 52 RC de la SEEP. pp. 147-154. Badajoz, (España).
- Reed, J.D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal Animal Science*, 73: 1516–1528.
- Riveros, E. y Argamentria, A. (1987). Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. II. Ensilados y pajas. *Avances en producción animal*, 12: 49-75.
- Rochinotti, D. (1998). Model components of forage-fed cattle systems: Energy expenditure of grazing cattle and prediction of intake in dairy cow. Ph.D Thesis. Diss., University of Florida. Gainesville, (E.E.U.U).
- Salcedo-Díaz, G. y Villar-Bonet, A. (2015). Interpretación del contenido de urea en leche. Claves para su minimización en las explotaciones de Cantabria. CIFA, Gobierno de Cantabria. Santander, (España).
- Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz., M.A., Fernández de Simón, B., Hernández, T. and Estrella, I. (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 58: 9631-9640.
- Sauvant, D., Perez, J.M. and Tran, G. (2004). Tables of composition and nutritional value of feed materials. Institut National de la Recherche Agronomique. Ed: Wageningen Academic Publishers, pp. 304. (Pays-Bas).
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1991). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Foli-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152-178.
- Soldado, A., Fernández, O., Martínez, A. and de la Roza-Delgado, B. (2003). Determinación rápida de almidón en ensilados de maíz mediante el empleo del analizador bioquímico YSI2700. *Izasa Lab*, 1: 22-23.
- Smith, L.A., Houdijk, J.G.M., Homer, D. and Kyriazakis, I. (2013). Effects of dietary inclusion of pea and faba bean as a replacement for soybean meal on grower and

- finisher pig performance and carcass quality. *Journal Animal Science*, 91: 3733-3741.
- Suárez, R., Díaz, N., Piñeiro, J. y Santoalla, C. (2004). Mezclas de avena, centeno y triticales con guisante y veza en siembras de primavera. En : Pastos y Ganadería Extensiva. B. García Criado et al. (Eds), pp. 399-403. Actas de la XLIV RC de la SEEP. Salamanca, (España).
- Sun, B., da Silva, J.M.R. and Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4267-4274.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. *Annals of Botany*, 91: 750-751.
- Terrill, T., Rowan, A., Douglas, G. and Barry, T., (1992). 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. PhD Thesis, Agricultural sciences, Université Blaise Pascal – Clermont, (France).
- Toral, P.G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E. and Frutos, P. (2013). Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 96: 431-439.
- Toral, P.G., Hervás, G., Missaoui, H., Andrés, S., Giráldez, F.G., 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, pp. 9. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016141-8989>.
- Tyrrell, H.F. and Reid, J.T (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 48: 1215-1223.
- Ucero, A., Haza, A.I., Arrang, N., García, A. y Morales, P. (2007). Agentes quimiopreventivos de la dieta (II): Indoles y polifenoles. *Alimentaria*, 7: 72-78.
- UNIP. (2014). Récolte et stockage de la féverole. Universidade Paulista, (Brasil). Available at: <http://www.unip.fr/feverole/recolte-et-stockage.html>.

- Van Soest, P.J., Robertson J.B. and Lewis B.A. (1991). Methods of dietary, neutral detergent fiber and starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- Vicente, F. (2002). Informe técnico I. Relación entre la concentración de urea en leche y el manejo nutricional del ganado vacuno lechero. Oviedo, SERIDA. KRK Ediciones.
- Waghorn, G. (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. and McNabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 383-392.
- Waterman, P.G. (1999). The tannins – an overview. En: Brooker J. D. (Eds). Tannins in livestock and human nutrition. Adelaide, Australian Centre for International Agricultural Research, pp. 10–13, (Australia).
- 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.
- Wittwer, FG., Gallardo, P., Reyes, J. and Opitz, H (1999). Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 38: 159-166.
- Zhang, D., Zhang, C., Tang, X., Li, H., Zhang, F., Rengel, Z., Whalley, W.R., Davies, W.J. and Shen, J. (2016). Increased soil phosphorus availability induced by faba bean root exudation stimulates root growth and phosphorus uptake in neighbouring maize. *New Phytologist*, 209: 823-828.
- Zitari, S. (2008). Etude des valeurs nutritives de certaines ressources alimentaires locales utilisées dans l'alimentation des animaux. Mémoire de master, Université Sousse, (Túnez).