

EFECTO DEL PASTOREO DE VERANO DE TRÉBOL VIOLETA SOBRE EL CONTENIDO EN OMEGA-3 DE LA LECHE DE VACUNO

G. FLORES¹, C. RESCH¹, B. FERNÁNDEZ-LORENZO¹, A. GONZÁLEZ-ARRÁEZ¹, J. VALLADARES¹, T. DAGNAC¹, A. LATORRE¹, M.J. AGRUÑA¹, S. PEREIRA¹, N. DÍAZ¹, R. GIMÉNEZ² y X. RODRÍGUEZ-DIZ³

¹Instituto Galego de Calidade Alimentaria. Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo (INGACAL-CIAM). Estrada Betanzos-Mesón do Vento, km 7. E-15318 Abegondo. A Coruña (España). gonzalo.flores.calvete@xunta.es

²INTA. EEA Manfredi. Córdoba (Argentina).

³Leyma Central Lechera S. A. Polígono de Sabón, parcela nº 136. E-15142 Arteixo. A Coruña (España).

RESUMEN

Se presentan resultados de un ensayo en el que se evaluó el efecto del pastoreo de praderas de trébol violeta y de raigrás inglés durante el verano sobre la producción y composición de ácidos grasos (AG) de la leche de vacuno. El experimento se realizó entre el 25 de julio y el 26 de septiembre de 2010, con tiempo seco y caluroso. La calidad nutricional del pasto se redujo conforme avanzaba la estación de pastoreo en ambos tratamientos, de forma menos marcada para el pasto de trébol violeta, que mostró valores superiores de digestibilidad de la materia orgánica (entre 3% y 5%) y de proteína (entre 35% y 60%) e inferiores de fibra neutro detergente (entre 35% y 36%) que los del raigrás a lo largo del ensayo. El perfil de AG de ambas especies fue predominantemente insaturado, representando el ácido α -linolénico el 55,8% y el 63,8% del total de AG para el trébol violeta y el raigrás inglés, respectivamente. La producción diaria de leche, materia grasa, proteína y extracto seco magro fue superior (+12,3%, +13,4%, +11,7% y +11,5% respectivamente) para las vacas que consumieron el pasto de trébol violeta. Los contenidos de la leche en grasa, proteína, lactosa y extracto seco magro no se vieron afectados por los tratamientos. El pastoreo de trébol violeta aumentó el contenido de la leche en ácido α -linolénico (+69,0%), AG *trans* C18:1, AG poliinsaturados totales (+29,2%), AG omega-3 totales (+54,0%) y redujo el ratio omega-6/omega-3 (-17,5%) respecto del raigrás inglés, mientras que no se detectaron diferencias significativas en el contenido en CLA total. Se concluye que el trébol violeta puede ser un cultivo forrajero útil para extender la estación de pastoreo en Galicia durante el verano en los sistemas de producción de leche diferenciada en base a su perfil saludable de AG para el consumidor.

Palabras clave: Leguminosas pratenses, vacas de leche, producción de leche, composición de la grasa.

INTRODUCCIÓN

Un número creciente de explotaciones de leche gallegas están interesadas en diferenciar su leche en base al modelo de manejo de la alimentación del ganado con pastos y forrajes. Se trata de conseguir de forma natural un producto con un perfil de ácidos grasos (AG) más acorde con las recomendaciones dietéticas de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003).

La grasa láctea contiene un balance de AG menos favorable que los de la grasa vegetal o los del aceite de pescado, conteniendo una alta concentración de C14:0 a C16:0 y bajas concentraciones relativas de AG poliinsaturados. La leche de vacuno es el tercer alimento en importancia en relación al consumo de lípidos por la población española detrás de los aceites vegetales de oliva y girasol (Toledano-Díaz, 2001), por lo que es de interés incidir en la modificación de su composición. En términos generales, el objetivo de modificar la composición de la leche de vaca es reducir las concentraciones de ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) debido a sus efectos hipercolesterolémicos y aumentar la concentración de AG insaturados, en particular los de la serie omega-3 y el ácido linoleico conjugado (CLA), considerados beneficiosos para la salud humana en numerosos estudios (por ejemplo Pariza, 1999; Parodi, 1999; Hughes y Dhiman, 2002; Lock y Baumann, 2004; Lock y Shingfield, 2004; Wahle *et al.*, 2004; Yaqoob *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2005). Recientemente se ha comprobado en modelos animales que el consumo de ácido vaccénico (C18:1 11t) produce efectos beneficiosos en la salud similares a los descritos para el CLA. (Field *et al.*, 2009).

En un reciente estudio de la Agencia Nacional Francesa de Seguridad Sanitaria de la Alimentación (ANSES, 2011) se recomienda, para la prevención del riesgo de determinadas enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neuropsiquiátricas, que en la dieta diaria el consumo de ácidos grasos saturados totales no supere el 12% del aporte energético total diario y no rebasar el 8% mediante la ingesta de los AG saturados láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0). Al mismo tiempo recomienda un consumo mínimo de determinados AG poliinsaturados considerados esenciales como el ácido linoleico (C18:2 n6c, cabeza de la serie omega-6) y el ácido α -linoléico (C 18:3 n3c, cabeza de la serie omega-3) fijando un intervalo de entre 2% y 5% del aporte energético diario total para el primero y de entre el 0,8% y 1% para el segundo.

La composición en ácidos grasos de la leche depende del genotipo de la vaca y del estado de lactación, pero el método más adecuado para influir en aquella es el manejo de la nutrición (Givens y Shingfield, 2006). Una dieta suplementada con lípidos de origen marino, aceites vegetales o semillas de oleaginosas ejerce un efecto positivo en la mejora del perfil lipídico de la leche (Dhiman *et al.*, 1999; Lock y Garnsworthy, 2002; Dewhurst *et al.*, 2006), si bien esta opción encarece notablemente el coste de la alimentación. En opinión de Elgersma *et al.* (2006), la alimentación de las vacas de leche con forrajes

representa la forma más natural, sostenible y económica de conseguir mejorar la calidad de la leche desde el punto de vista nutricional. La alimentación con forrajes aumenta el contenido en AG poliinsaturados omega-3 y de CLA de la leche (Dewhurst *et al.*, 2003a, 2006) puesto que aquellos son una fuente natural rica en ácido α -linolénico (C18:3 n-3) y el CLA proviene mayoritariamente de la biohidrogenación ruminal del α -linolénico a ácido vaccénico y la posterior desaturación de éste en la glándula mamaria (Harvatine *et al.*, 2009). Las leguminosas en general y el trébol en particular tiene el potencial de mejorar el perfil de AG de la leche en términos de las recomendaciones dietéticas actuales para los humanos (Dewhurst *et al.*, 2003b).

Ciertas industrias lácteas gallegas bonifican la leche enriquecida de forma natural en AG del grupo omega-3 respecto de la leche estándar, lo que constituye un estímulo económico para los ganaderos. Normalmente las explotaciones que están en este programa realizan el pastoreo de las praderas (dominadas por especies gramíneas, fundamentalmente raigrás inglés) durante el período de comienzos de primavera a mediados o finales de julio, lo que combinan con la suplementación al ganado en el establo. A partir de esta época empieza a sentirse el efecto de la falta de humedad sobre el crecimiento de los pastos y su calidad se deteriora, siendo preciso alimentar al ganado con ensilados. Esto provoca un aumento de los gastos en alimentación no sólo por el mayor coste de los ensilados respecto del forraje pastado, sino porque es preciso recurrir a la suplementación de la ración con semillas o aceites de oleaginosas ricos en AG poliinsaturados (por lo general lino) a fin de mantener el perfil graso de la leche requerido por la industria.

En esta situación los ganaderos muestran interés por conocer las posibilidades de poder ampliar la estación de pastoreo mediante la utilización de especies pratenses que extiendan su estación de crecimiento en el verano manteniendo un adecuado valor nutricional. El trébol violeta (*Trifolium pratense* L.) ofrece ventajas específicas como planta pratense comparada con otras especies de climas templados. Entre ellas se cita la presencia de la enzima polifenol oxidasa en esta planta que mejora la utilización del N y la protección a la saturación de los lípidos en el rumen (Sullivan y Hatfield, 2006). Es una excelente forrajera utilizada para ensilar y en pastoreo que une a su propiedad de ser una planta mejorante del suelo otras características agronómicas positivas como la facilidad de establecimiento, vigor temprano, rápido crecimiento, alto valor nutricional y buen rendimiento (Smith, 2000). Su raíz profunda, por otra parte, permite extraer humedad de horizontes inferiores del suelo y presentar un mejor comportamiento a las situaciones de falta de humedad, comparado con los raigrases (Brown *et al.*, 2005).

A pesar de estas ventajas, tal y como indica Piñeiro (2002) en su análisis sobre la situación de los prados y praderas de Galicia, en el último cuarto del pasado siglo se observó una reducción en el uso de esta leguminosa, en paralelo a la evolución de

los sistemas de producción de leche hacia modelos intensivos. En la actualidad es una especie poco utilizada, como lo demuestra el hecho de que las compras de esta semilla por parte de las cooperativas agrarias gallegas suponían a finales de los noventa aproximadamente el 3% del total de las semillas forrajeras adquiridas. No hay en la bibliografía mucha información relativa al efecto de la alimentación con trébol violeta consumido en pastoreo sobre la respuesta productiva y composición de la leche de vacuno, siendo mucho más abundante para el caso de los ensilados, lo cual se relaciona con que esta leguminosa resiste mal su aprovechamiento a diente con presiones altas de pastoreo y con su limitada persistencia en el terreno (Wilkins y Jones, 2000; Ford y Barret, 2011).

En el presente artículo se presentan resultados de un ensayo en el que se evaluó el efecto del pastoreo de praderas de de trébol violeta y de raigrás inglés durante el verano sobre la producción y composición de la leche de vacuno. Estos trabajos están orientados a mejorar e innovar los sistemas forrajeros de las explotaciones lecheras gallegas, y se realizan en el CIAM dentro del proyecto de investigación PGIDIT 09MRU012Y titulado “Leche de vaca rico en componentes funcionales obtenido de forma natural mediante la alimentación con pastos y leguminosas forrajeras en las granjas de Galicia”, liderado por la empresa Leyma Central Lechera S.A. y cofinanciado por la Xunta de Galicia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización y duración del ensayo

El estudio se realizó desde finales de julio a finales de septiembre de 2010 en la finca del CIAM sita en Mabegondo (Abegondo, A Coruña). La finca está situada en la zona de influencia de las Rías Altas en la costa atlántica de Galicia, a una altitud de 100 m sobre el nivel del mar, con suelos de tipo cambisol húmico, de textura franco-limosa y de fertilidad media. Se evaluaron dos tratamientos de pastoreo con vacas de leche (praderas monofitas de raigrás inglés y de trébol violeta) con tres períodos de ensayo, precedidos por dos semanas de adaptación de los animales a los tratamientos, que se extendieron del 25 de julio al 15 de agosto (período 1); del 16 de agosto al 5 de septiembre (período 2) y del 6 al 26 de septiembre (período 3).

Pastos

Se utilizaron dos parcelas de dos ha cada una, en cultivo monofito de trébol violeta (cv. Lemmon, diploide) y de raigrás inglés, (cv. Heraut, diploide) a dosis de 40 kg y 30 kg de semilla/ha, respectivamente. Esta había sido sembrada en otoño de 2007 mientras que aquella lo había sido finales de marzo de 2010. La semilla de leguminosa estaba

inoculada. La fertilización se ajustó a lo indicado por Piñeiro *et al.* (2009) para cultivos forrajeros en suelos de moderada acidez y contenido medio en fósforo e postasa.

Animales

Fueron utilizados 15 vacas lecheras de raza Holstein del rebaño experimental del CIAM, pluríparas, que estaban en el 5º mes de lactación (fecha media de parto del 20 febrero de 2010), de un potencial productivo moderado (8 000 kg de promedio por lactación). Las vacas fueron asignadas al azar a tres grupos homogéneos en cuanto a su producción media del período preexperimental, días en leche y número de parto. El ensayo estaba inicialmente diseñado para evaluar tres tratamientos de pasto (las dos especies referidas en el presente artículo y un pasto de alfalfa), pero este último hubo de ser descartado debido a la escasa implantación de la especie sembrada. Por esta razón en cada período sólo se utilizaron en el ensayo dos de los grupos, que se iban alternando, de forma que todos los animales pasaron al final del ensayo por los dos tratamientos de pastoreo. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día, a las 8:00 h y a las 20:00 h. El pastoreo tenía lugar durante el día, entre los dos ordeños, permaneciendo las vacas estabuladas por la noche. La dieta consistió en el consumo de pasto a voluntad durante el pastoreo y una mezcla *unifeed* en el establo, ofrecida en grupo a las 5 vacas de cada tratamiento, consistente en 23 kg de ensilado de planta entera de maíz (33% de materia seca) y dos kg de concentrado comercial con un 23,5% de proteína bruta, cuya composición (en porcentaje sobre peso fresco) era del 45,1% de soja; 44,8% de harina de maíz; 5,0% de cascarilla de soja y 5,1% de un corrector vitamínico-mineral. El manejo del pastoreo de las vacas se realizó con la ayuda de dos hilos móviles electrificados, siguiéndose el manejo apuntado por Vázquez-Yáñez *et al.* (2005) por el cual los animales se cambiaban cada dos o tres días cuando la altura media de la hierba pastada era igual o inferior a 10 cm. La superficie de las subparcelas era variable, entre 1500 m² y 2000 m² y la medida de altura del pasto en la zona pastada se determinó diariamente mediante una regla graduada, efectuando un total de 50 contactos, al azar, por subparcela. El diseño de la zona de pastoreo en cada tratamiento fue realizado de forma que las vacas tuvieran siempre acceso a una zona arbolada donde los animales podían descansar a la sombra y disponían de agua fresca. El grupo de vacas que en cada período no estaba incluido en el ensayo pastaba una pradera mixta de gramínea-leguminosa y recibía la misma suplementación que los otros dos grupos. Los animales se pesaron durante dos días consecutivos a la misma hora, tras el ordeño de la mañana, al comienzo del período preexperimental y al comienzo y al final de cada período.

Toma de muestras

La producción de leche de cada vaca en cada ordeño fue registrada diariamente a lo largo de todo el ensayo. Las tomas de muestras de leche, pastos, ensilado de maíz

y pienso se concentraron en la última semana de cada período. Se tomaron muestras individuales de leche de cada vaca durante tres días (martes a jueves) en seis ordeños consecutivos de mañana y tarde en la citada semana. Uno de los días de la misma, e inmediatamente antes de la entrada del ganado en una subparcela nueva, se tomaron unos 250 kg de pasto de cada tratamiento mediante una motosegadora de 0,90 m de anchura de peine. Estas muestras fueron introducidas en sacos de plástico de 75 L de capacidad y conservadas congeladas a -20° C hasta la determinación de la evaluación de digestibilidad *in vivo* a la finalización del ensayo de pastoreo con las vacas de leche. Antes de cerrar los sacos en la parcela se tomaron dos alícuotas del pasto de cada tratamiento de 1000 g cada una, manteniendo en nevera con hielo una de ellas, que fue inmediatamente secada en estufa a 80° durante 16 h y posteriormente conservada a 4° C para determinación de AG y la otra se trasladó al laboratorio para la determinación de materia seca y realización del análisis florístico, análisis de composición química y determinación de digestibilidad *in vitro*. Un día por semana se tomaron muestras del ensilado de maíz y del pienso ofrecido al ganado para determinación de materia seca y análisis químico.

Análisis fisicoquímico de la leche

Las muestras de leche de cada ordeño se mantuvieron refrigeradas a 4° C y se trasladaron inmediatamente al Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de Leche (LIGAL), donde se estimaron los contenidos en grasa, proteína, lactosa y extracto seco magro por espectroscopía infrarroja (Milkoscan), según el procedimiento interno PE/LIGAL/34 del citado laboratorio.

Análisis químico-bromatológico de muestras de pastos, ensilado de maíz y pienso

La preparación de las muestras de forrajes y concentrados para las posteriores determinaciones por vía húmeda se realizó mediante secado en estufa de aire forzado Unitherm, a 80° C, durante 16 horas, determinando el contenido en materia seca por gravimetría y posterior molido a 1 mm en molino de martillos Christy&Norris. Sobre las muestras molidas de pastos y de ensilado de maíz se determinaron: el contenido en humedad residual y cenizas (CZ) mediante desecación a 102° C y posterior calcinación secuencial a 460° C en un analizador termogravimétrico MAC500 de Leco (LECO Corporation, St. Joseph, MI, EEUU); el de proteína bruta (PB), expresada como nitrógeno (N) total $\times 6,25$, determinándose el N mediante digestión micro Kjeldahl seguida de la determinación colorimétrica del ión amonio, según el método descrito por Castro *et al.*, (1990) adaptado al autoanalizador de flujo continuo AAIII (Bran-Luebbe, Inc., Technicon Industrial Systems Corp., Tarrytown, NY, EEUU); el de Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD), Celulosa (CEL) y Lignina (LAD) se realizaron siguiendo los procedimientos propuestos por Van Soest y Robertson (1991) para FND y por Goering y Van Soest (1970) para FAD, CEL y LAD, adaptados

al digestor Fibertec System modelo 1020 de la marca Foss Tecator y al FibreAnalyzer (ANKOM Technology Co., Fairport, NY, USA); el contenido en carbohidratos no estructurales (CNET) y carbohidratos solubles en agua (CSA) se realizó según Castro (2000) y el análisis de grasa total (EE) se realizó por el método oficial AOAC (2003) para forrajes, cereales-grano y alimentos animales en general, utilizando un equipo Soxtec TM 2050 de FOSS (FOSS Analytical AB, Högenäs, Suecia). La determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DoTT) de las muestras de forrajes se realizó mediante el método de Tilley-Terry modificado por Alexander y McGowan (1969), utilizando como animales donantes dos vacas secas canuladas en rumen, alimentadas a nivel de mantenimiento con una dieta compuesta por heno de buena calidad, ensilado de hierba de pradera, ensilado de maíz y un concentrado del 23,5% PB a base de harina de cebada y soja. El análisis del concentrado se realizó por NIRS en las dependencias del LIGAL.

Digestibilidad *in vivo* del pasto

Por cada tratamiento se utilizaron seis carneros castrados de más de dos años de edad, de raza gallega, alojados en jaulas metabólicas dotadas con separadores de heces y orina. Los animales dispusieron de un corrector vitamínico-mineral a libre disposición y recibieron las dietas a evaluar como único alimento, que se ofreció en una única comida a primera hora de la mañana a un nivel restringido equivalente a unos 35 g de materia seca (MS) por kg de peso vivo metabólico ($P^{0,75}$) inicial. La ración diaria de los animales de cada tratamiento se preparó mediante la mezcla del pasto, previamente descongelado, procedente de cada uno de los tres períodos del ensayo de pastoreo con vacas de leche. La evaluación constó de un período de adaptación de los animales de 10 días de duración, seguido por 11 días continuados de pesaje y muestreo diario del alimento ofrecido, rechazado y las heces producidas, para cada animal. El muestreo se realizó una sola vez al día, tomándose una alícuota del 10% del alimento ofrecido y rechazado y el 20% de las heces producidas para cada animal. Las muestras tomadas diariamente se acumularon congeladas a -20 °C, hasta el final del ensayo. Las muestras de alimento ofrecido se analizaron para MS, MO, N, FND, FAD, CEL, LAD, CNET, CSA y DoTT y las de alimento rechazado y las de heces para MS, MO, N y FND según los métodos descritos en el apartado anterior.

Análisis de ácidos grasos en muestras de pastos

La preparación de las muestras de pasto para el análisis de AG se realizó mediante secado en estufa a 80° C durante 16 h y posterior molienda a 1 mm. Se adoptó esta metodología por adaptarse mejor a las rutinas de laboratorio del CIAM en función de los resultados expuestos por Arvidson *et al.* (2009) y de trabajos previos realizados en el CIAM (Dagnac, datos no publicados), relativos a comparación de métodos

de preparación de la muestra de forraje antes de la extracción de AG. Sobre las muestras molidas los AG fueron simultáneamente extraídos y metilados mediante el procedimiento propuesto por Sukhija y Palmquist (1988) con alguna modificación. Para ello se añadieron 1 ml de tolueno y 1 ml de patrón interno C19:0 (1 mg/ml) a 250 mg de muestra de forraje, seguido de la adición de 3 ml de disolución de ácido clorhídrico metanólico (preparado a partir de acetil cloruro y metanol). Tras de la agitación un minuto en agitador vortex, las muestras se incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 70 °C. Posteriormente la solución se enfrió a temperatura ambiente y se le añadieron 5 ml de disolución de carbonato potásico al 6%, 2 ml de hexano, 1 g de sulfato sódico anhidro y 2 g de carbón activado. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 5 min (2500 rpm, 20°C) y la fase orgánica (sobrenadante) se evaporó en corriente de nitrógeno hasta obtener un residuo aceitoso que se disolvió en 0,8 ml de hexano y se congeló hasta su análisis por cromatografía de gases. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados, identificados y cuantificados por cromatografía de gases utilizando un equipo TRACE ULTRA (Thermo Scientific) con detector de ionización de llama (FID), Autosampler modelos AI/AS 3000 (Thermo Scientific) y software Chrom Card Gas Chromatography Data System (Thermo Scientific). Se empleó una columna capilar de sílice SPTM_2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm) y el gas portador fue el helio con un flujo de 0,6 ml/min. Las temperaturas de inyector y del detector fueron 250 y 260 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µl fijando la temperatura inicial de la columna a 140°C durante 5 min, aumentando posteriormente a 200°C con un flujo de 4°C/min y manteniendo esta temperatura durante 5 min. Finalmente la temperatura subió a 240°C con un flujo de 3°C/min durante 5 min y se mantuvo así 38 min. Cada ácido graso fue cuantificado a través de calibración interna utilizando como patrones internos los ácidos C 9:0, C17:1, y C20:2 metilados.

Análisis de ácidos grasos en muestras de leche

Las muestras de leche pertenecientes al ordeño diario de cada vaca se mantuvieron congeladas a -20° C y el análisis de AG se realizó en el laboratorio de control de calidad de la empresa LEYMA, S.A. La extracción y metilación de AG se realizó a partir de 2 mL de leche a la que se le añadieron 15 mL de metóxido sódico al 1,5% en metanol en un matraz aforado de 100 mL. Tras colocar en el matraz un refrigerante de aire y mantenerlo en estufa a 75° C durante 10 min con reflujo de suave, se añadieron 15 mL de ácido sulfúrico al 3% en metanol y permaneció en la estufa otros 10 min en las mismas condiciones. Enfriado el matraz a temperatura ambiente se añadieron 4 mL de hexano y se completó el aforo del matraz con cloruro sódico al 5% en agua destilada. La separación de fases fue completa a los 5 minutos, transcurridos los cuales se extrajo 1 mL del sobrenadante y se transfirió aun vial de 2 mL para su inyección en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6850 Network GC System) con FID dotado de una

columna capilar Supelco SP2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 μ m, usando helio como gas portador. Los estándares internos utilizados fueron Supelco 37 Component FAME Mix y Cienytech Fish Oil FAME Mixture. Las temperaturas del inyector y el detector fueron de 260 °C y el volumen de inyección fue de 3 μ L fijando la temperatura inicial del horno en 140 °C durante 5 min aumentando posteriormente a un flujo de 4° C/min hasta alcanzar los 240° C.

Análisis estadístico

Para el ensayo de producción de leche se utilizó el modelo $Y = \mu + P + R + B + e$, donde la especie de pasto (P) se considerará factor fijo, mientras que el animal (R, repetición) y el período (B) se considerarán como factores aleatorios. Para el ensayo de digestibilidad *in vivo* se siguió un modelo completamente aleatorizado, con seis repeticiones.

Los procedimientos utilizados en los análisis fueron PROC GLM y PROC MIXED de SAS (SAS Institute, 2002-2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo se realizó durante los dos meses más calurosos del verano del año 2010, con temperaturas ligeramente por encima del promedio de la zona. Las máximas diarias de los períodos 1° a 3° fueron, respectivamente, 33,4°C, 32,5°C y 33,4°C. La precipitación total registrada durante el ensayo ascendió a 42,2 mm, cantidad que fue un 40% inferior a la media de la zona para el citado período (70,3 mm) y que se correspondieron a 14 días con lluvia (3,01 mm/día) centrados en los períodos 2° y 3°, con siete y cuatro días de lluvia, respectivamente. A pesar de la elevada temperatura y de la escasa cuantía de las precipitaciones, los pastos de leguminosas y, en menor medida, el de gramíneas resistieron bien el calor y no se agostaron, si bien el raigrás estaba visiblemente espigado y el trébol violeta estaba al 50% de floración desde el comienzo del ensayo. En cuanto a la composición botánica media del pasto a lo largo del ensayo las fracciones “gramíneas” “leguminosas” y “otras especies” (expresadas en porcentaje sobre materia seca) de los dos tratamientos fueron, respectivamente, para el pasto de raigrás inglés, de 93,30%, 1,89% y 4,81%; y para el pasto de trébol violeta de 5,39%, 74,94% y 19,67% . La fracción “otras especies” estaba representada mayoritariamente por especies adventicias, predominando *Plantago* spp. y *Rumex* spp. en menor medida.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la evaluación *in vivo* de las muestras de pasto acumuladas a lo largo del ensayo, mostrando que el pasto de trébol violeta presentó un valor nutritivo medio más elevado que el de raigrás inglés. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (DMS), de la materia orgánica (DMO), del nitrógeno (DN) y de la fibra neutro detergente (DFND) fueron significativamente

superiores para el pasto de trébol violeta comparado con el de raigrás siendo observados, respectivamente, valores de: DMS 60,3% y 55,6%; DMO 61,4% y 55,5%; DN 59,1% y 55,3% y DFND 56,9% y 54,0%. Los valores medios de proteína bruta (PB) y de fibra neutro detergente (FND) del pasto de trébol violeta y de raigrás fueron, respectivamente, PB 15,0% y 10,4% MS y FND 49,6% y 62,2% MS.

TABLE 1
Digestibilidad *in vivo* y composición química media del pasto en oferta.
*Average *in vivo* digestibility and chemical composition of pasture on offer.*

| | TIPO DE PASTO | | |
|---|---------------|---------|---------------|
| | T. VIOLETA | RAIGRÁS | Significación |
| Digestibilidad <i>in vivo</i> (%): | | | |
| Materia Seca (DMS) | 60,3 | 55,6 | <0,001 |
| Materia Orgánica (DMO) | 61,4 | 55,5 | <0,001 |
| Nitrógeno (DN) | 59,1 | 55,3 | <0,001 |
| Fibra Neutro Detergente (DFND) | 56,9 | 54,0 | <0,001 |
| Fibra Acido Detergente (DFAD) | 48,9 | 45,3 | <0,001 |
| Materia seca y composición químico-bromatológica | | | |
| Materia Seca (MS, %) | 19,0 | 32,4 | - |
| Materia orgánica (%MS) | 85,7 | 88,6 | - |
| Proteína bruta (%MS) | 15,0 | 10,4 | - |
| Carbohidratos no estructurales (%MS) | 5,0 | 8,6 | - |
| Composición de la pared celular | | | |
| Fibra neutro detergente (%MS) | 49,6 | 62,2 | - |
| Fibra ácido detergente (%MS) | 35,9 | 35,2 | - |
| Celulosa (%MS) | 27,9 | 28,7 | - |
| Lignina (%MS) | 8,5 | 5,3 | - |

La evolución del contenido de proteína, fibra neutro detergente y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DoTT) de las especies sembradas a lo largo de los tres períodos del ensayo (Tabla 2) pone en evidencia el descenso de calidad del forraje con el avance de la estación. Entre el primer y tercer período, la PB se redujo de 16,2% a 14,4% MS para el trébol y de 12,0% a 9,0% MS para el raigrás, la digestibilidad también disminuyó en ambas especies de 67,6% a 61,4% y de 65,7% a 58,8%, mientras la FND aumentó de 39,0% a 43,9% MS y de 60,6% a 67,5% MS, respectivamente. Esta pérdida de calidad, si bien se produce tanto para la leguminosa como para la gramínea es claramente menos marcada para el trébol violeta y confirma la mejor calidad nutricional de esta especie observada en la evaluación *in vivo*.

TABLA 2

Evolución del contenido en proteína, fibra y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica de las especies sembradas a lo largo del pastoreo de verano.

Evolution of protein and fiber contents and organic matter in vitro digestibility of sown species throughout summer grazing.

| Período | PB (%MS) | | FND (%MS) | | DoTT (%) | |
|-----------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| | T. VIOLETA | RAIGRÁS | T. VIOLETA | RAIGRÁS | T. VIOLETA | RAIGRÁS |
| 25/7-15/8 | 16,2 | 12,0 | 39,0 | 60,6 | 67,6 | 65,7 |
| 16/8-5/9 | 14,5 | 9,1 | 41,1 | 63,8 | 64,6 | 62,9 |
| 6/9-26/9 | 14,4 | 9,0 | 43,9 | 67,5 | 61,4 | 58,8 |

PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; DoTT: digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

En la Tabla 3 se muestra la composición media de ácidos grasos de las muestras de pasto del ensayo. Se pone de manifiesto el carácter predominantemente no saturado de los lípidos del forraje, observándose diferencias entre los dos tipos de pasto. Para el trébol violeta, los AG más abundantes son los poliinsaturados α -linolénico (55,5%) y linoleico (18,5%), seguido del AG saturado ácido palmítico (15,6%), mientras que para el raigrás el α -linolénico es también el de mayor concentración (63,8%), seguido del palmítico (13,3%) y del linoleico (10,5%). Atendiendo a la suma de los AG de las series omega-6 y omega-3, el trébol violeta y el raigrás mostraron valores, respectivamente, de 55,8% y 64,1% (total AG omega-3) y de 19,3% y 11,2% (total AG omega-6).

La producción media diaria de leche estandarizada al 3,5% de grasa (Hutjens 2006) del tratamiento de pastoreo de trébol violeta fue de 27,13 kg y superó en un 12,3% a la del raigrás (24,29 kg), manifestándose así la comparativamente mejor calidad nutricional del trébol violeta. Se estima que la dieta *unifeed* (ensilado de maíz+concentrado) ofrecida a las vacas en el establo, que ascendía a unos 9,5 kg de MS vaca⁻¹ día⁻¹, suministró aproximadamente la mitad de la ingesta potencial diaria de las vacas en el avanzado estado de lactación que se encontraban. Se llama la atención acerca de que las producciones citadas se obtuvieron con un consumo de pienso muy reducido, de 2 kg vaca⁻¹ día⁻¹. Referido a la leche producida, el consumo de concentrado osciló entre 74 g/L y 82 g/L para el pasto de trébol violeta y el de raigrás inglés, respectivamente.

La leche del tratamiento de pastoreo de trébol violeta tenía 1,3 décimas más de materia grasa (MG) y 0,7 décimas más de materia proteica (MP) que la del de raigrás, si bien estas diferencias no llegaron a ser significativas, al igual que para el extracto seco magro (ESM). Los valores promedio del ensayo fueron: MG 3,88%, MP 3,09%, y ESM 8,46%, valores que están dentro de un rango normal. La mayor producción de leche registrada para el pasto de trébol violeta hizo que el rendimiento medio diario de los citados componentes fueron significativamente superiores en este tratamiento, con valores de 1,00 kg/día, 0,78 kg/día y 2,14 kg/día para MG, MP y ESM, respectivamente.

TABLA 3

Composición de ácidos grasos en las muestras de trébol violeta y raigrás inglés durante el pastoreo de verano.

Fatty acids composition of red clover and perennial ryegrass samples during summer. grazing.

| Ácido graso | | g/100g de AG totales | | g/kg de materia seca | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| Símbolo | Nombre | T. VIOLETA | RAIGRÁS | T. VIOLETA | RAIGRÁS |
| C12:0 | Láurico | 0,86 | 1,43 | 0,10 | 0,16 |
| C14:0 | Mirístico | 0,33 | 1,08 | 0,04 | 0,12 |
| C15:0 | Pentadecílico | 0,28 | 0,20 | 0,03 | 0,02 |
| C16:0 | Palmítico | 15,60 | 13,31 | 1,87 | 1,53 |
| C16:1 | Palmitoleico | 0,15 | 0,24 | 0,02 | 0,03 |
| C17:0 | Margárico | 0,30 | 0,32 | 0,03 | 0,03 |
| C18:0 | Estearico | 2,34 | 2,46 | 0,28 | 0,28 |
| C18:1 n9c | Oleico | 1,92 | 1,97 | 0,23 | 0,22 |
| C18:2 n6c | Linoleico | 18,54 | 10,54 | 2,25 | 1,21 |
| C20:0 | Araquídico | 0,85 | 0,72 | 0,10 | 0,08 |
| C18:3 n6 | γ -Linolénico | 0,35 | 0,46 | 0,04 | 0,05 |
| C20:1n9c | Eicosanoico | 0,23 | 0,17 | 0,03 | 0,02 |
| C18:3 n3c | α -Linolénico | 55,59 | 63,82 | 6,92 | 7,14 |
| C22:0 | Behénico | 0,85 | 1,40 | 0,10 | 0,16 |
| C20:3 n6 | Eicosatrienoico | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C22:1 n9 | Erúxico | 0,07 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| C20:3 n3 | Eicosatrienoico | 0,26 | 0,32 | 0,03 | 0,03 |
| C20:4 n6 | Araquidónico | 0,41 | 0,27 | 0,05 | 0,03 |
| C24:0 | Lignocérico | 0,94 | 1,30 | 0,11 | 0,14 |
| <i>Ácidos grasos totales</i> | | 100,00 | 100,00 | 12,24 | 11,25 |
| <i>AG omega-6 *</i> | | 19,30 | 11,26 | 2,34 | 1,29 |
| <i>AG omega-3 **</i> | | 55,85 | 64,14 | 6,95 | 7,17 |
| <i>Relación omega-6/omega-3</i> | | 0,35 | 0,18 | - | - |

* Total Omega-3 = Suma de C18:3 n-3 y C20:3 n-3

** Total Omega-6 = Suma de C18:2 n-6c, C18:3 n-6, C20:3 n-6 y C20:4 n-6

La baja concentración de urea en leche del tratamiento de raigrás (127 mg/L) muestra un posible déficit de proteína en la ración consumida por las vacas, consecuencia del avanzado estado fisiológico de la gramínea, mientras que para el trébol violeta dicho valor fue significativamente superior (223 mg/L). Valores situados en el rango de 200 mg - 300 mg de urea/L se identifican con un adecuado suministro de proteína en la dieta de vacas de leche (Ferguson, 2000).

El tipo de pasto afectó a la variación de peso vivo de las vacas, que ganaron menos peso en el tratamiento de pastoreo de trébol violeta (0,095 g/día) comparado con el de

raigrás (0,698 g/día). Puesto que el consumo de dietas bajas en proteína por vacas de leche, en comparación con dietas equilibradas, modifica el reparto de energía ingerida hacia una mayor ganancia de peso vivo y menor producción de leche (Law *et al.*, 2009), el reducido contenido proteico de la dieta de raigrás pudo haber favorecido un balance energético más positivo que el de los animales que pastaban el trébol violeta.

TABLA 4
Efecto del tipo de pasto sobre la producción y composición de la leche.
Effect of pasture type on yield and constituents of milk.

| | TIPO DE PASTO | | Significación |
|--|---------------|---------|---------------|
| | T. VIOLETA | RAIGRÁS | |
| Producción de leche (PL, kg/día) | | | |
| PL no corregida | 25,19 | 23,07 | <0,001 |
| PL _{MG} corregida al 3.5% de grasa ¹ | 27,13 | 24,29 | <0,001 |
| PL _{MGP} corregida al 3.5% de grasa y 3.5% de proteína ² | 26,58 | 23,79 | <0,001 |
| Producción de grasa y proteína (g/día) | | | |
| Materia grasa | 1001 | 882 | <0,001 |
| Materia proteica | 787 | 704 | <0,001 |
| Extracto seco magro | 2145 | 1942 | <0,001 |
| Composición fisicoquímica de la leche | | | |
| Materia grasa (%) | 3,95 | 3,82 | ns |
| Materia proteica (%) | 3,12 | 3,05 | ns |
| Lactosa (%) | 4,58 | 4,56 | ns |
| Extracto seco magro (%) | 8,50 | 8,42 | ns |
| Urea (mg/L) | 223 | 127 | <0,001 |

¹ PL_{MG}=0,4324 x PL+16,216 x PL x MG/100; donde: PL_{MG}=kg leche corregida al 3,5% grasa; PL= kg leche no corregida; MG= porcentaje de grasa

² PL_{MGP}=0,323 x PL+12,82 x PL x MG/100 + 7,13 x PL x MP/100; donde: PL_{MGP}=kg leche corregida al 3,5% grasa y 3,5% de proteína; PL= kg leche no corregida; MG y MP: porcentajes de grasa y proteína, respectivamente.

Los resultados del análisis de los ácidos grasos de la leche producida a lo largo del ensayo (Tabla 5) indican que no se detectaron diferencias significativas en cuanto al contenido en AG saturados de cadena media (C12 a C16) y larga (C18 a C22) ni en el de AG saturados totales. Los componentes mayoritarios de este grupo fueron los ácidos palmítico (C16:0) y mirístico (C14:0), con valores medios (en porcentaje sobre los AG totales, AGT) de 12,16% y 39,62% , siendo el del total de saturados de 71,86% AGT. Se destaca el elevado contenido en ácido palmítico con relación al indicado por otros estudios, que por lo regular se sitúa ligeramente por debajo del 30% en dietas con forrajes tiernos o dietas ricas en concentrados (Pacard *et al.*, 2006; Shingfield *et al.*, 2008). Existe, sin embargo, una correlación positiva entre el porcentaje de fibra en

la ración y el contenido en palmítico, citándose contenidos del orden del 34% AGT de C16:0 con dietas del 50% de forrajes fibrosos (Grummer, 1991), pudiendo llegar hasta el 42% AGT como límite superior (Paccard *et al.*, 2006).

El pastoreo del trébol violeta aumentó significativamente el contenido de ácido linoleico (C18:2 n6c), de α -linolénico (C18:3 n3c), de AG poliinsaturados totales y de los AG totales de las series omega-6 y omega-3, mientras que disminuyó la relación omega-6 /omega-3 y la concentración de ácido oleico (C18:1 n9c). Aunque el contenido en CLA no fue estadísticamente diferente entre tratamientos, la leche procedente del de trébol violeta mostró una concentración superior de ácidos grasos *trans* monoinsaturados de 18 átomos de C, cuyo principal componente es el ácido vaccénico, precursor del CLA en la glándula mamaria y en el cuerpo humano (Turpeinen *et al.*, 2002) por lo que su presencia en la leche es de relevancia nutricional. Los valores medios (en porcentaje sobre AGT) para el trébol violeta y el raigrás inglés fueron, respectivamente: ácido oleico 18,17% y 19,27%; ácido linoleico 1,72% y 1,34%; α -linolénico 0,93% y 0,55%; ácidos *trans*-C18:1 2,33% y 2,08%; AG poliinsaturados totales 4,29% y 3,32% ; CLA 0,76% y 0,69%; AG omega-6 totales 2,31% y 1,82%; AG omega-3 totales 1,14% y 0,74% y la relación omega-6 /omega-3 2,08 y 2,52. Estos resultados indican que la leche producida con pasto de trébol violeta mostró una composición más saludable comparada con el tratamiento de raigrás inglés. Se hace notar que la leche producida en el tratamiento de pastoreo de trébol violeta cumple los requerimientos exigidos por la empresa para este producto, mientras que la obtenida en el pastoreo de raigrás inglés quedaría por debajo de los valores establecidos.

En un experimento donde se comparaban dietas a base de pastos frescos de raigrás inglés y trébol violeta en un sistema de "zero grazing" y 2 kg de concentrado/día, Lee *et al.* (2009) encuentran que los respectivos valores de proteína (3,18% vs. 3,11%), α -linolénico (1,47% vs. 0,81% AGT) y los AG totales de cadena larga (≥ 20 C, 0,70% vs. 0,50% AGT) eran más elevados en la leche de las vacas que consumieron el trébol violeta. Los resultados de nuestro ensayo coinciden, en líneas generales, con los observados por dichos autores.

Es frecuente encontrar en la bibliografía valores del ácido α -linolénico superiores al 1% de AGT en la leche de vacas que consumen pastos jóvenes, Se ha demostrado, sin embargo, que cuando el estado de madurez del forraje es más avanzado dichos valores suelen ser más bajos, como respuesta a la menor concentración de C18:3 n3c en la materia seca del pasto. Ferlay *et al.* (2006) encuentran que en las tres primeras semanas de pastoreo de la temporada, la leche de vacas pastando una pradera natural tenía valores de 1,2% AGT de α -linolénico, mientras que dicha concentración descendía al 0,8% AGT a las 6 semanas. Resultados semejantes, reportados por Delaby *et al.* (2002) y Kay *et al.* (2005) han sido atribuidos al avanzado estado vegetativo de la hierba en pastoreos

tardíos. Atendiendo a los resultados de nuestro estudio, esto sucede para el raigrás inglés (0,74% de AG omega-3 totales en la leche) pero no para el trébol violeta, que mostró una concentración un 50% superior (1,14% de AG omega-3). En correspondencia con el mayor nivel de α -linolénico de la leche, la relación omega6/omega3 fue un 20% inferior para el tratamiento de pastoreo de trébol violeta comparado con el de raigrás, observación que confirma resultados de otros estudios realizados con las mismas especies (Van Dorland *et al.*, 2008).

TABLA 5

Efecto del tipo de pasto sobre la composición de ácidos grasos de la leche.

Effect of pasture type on fatty acids milk composition.

| Composición (en % de AG totales) | TIPO DE PASTO | | Significación |
|--|---------------|---------|---------------|
| | T. VIOLETA | RAIGRÁS | |
| C12:0 | 3,12 | 2,96 | ns |
| C14:0 | 12,25 | 12,08 | ns |
| C16:0 | 39,49 | 39,76 | ns |
| C18:0 | 8,91 | 9,19 | ns |
| C20:0 | 0,16 | 0,14 | ns |
| C22:0 | 0,06 | 0,06 | ns |
| C16:1 | 1,90 | 2,04 | ns |
| C18:1 n9c | 18,17 | 19,27 | 0,0047 |
| <i>trans</i> C18:1 | 2,33 | 2,08 | 0,0447 |
| C20:1 | 0,03 | 0,03 | ns |
| C18:2 n6c | 1,72 | 1,34 | <0,0001 |
| C18:2 n6t | 0,23 | 0,12 | <0,0001 |
| CLA total (C18:2 9c11t y otros isómeros) | 0,76 | 0,69 | ns |
| C18:3 n3c | 0,93 | 0,55 | <0,0001 |
| C18:3 n6c | 0,15 | 0,14 | ns |
| C20:4 n6c | 0,10 | 0,09 | ns |
| C20:5 n3c | 0,08 | 0,06 | <0,0001 |
| C22:5 n3c | 0,12 | 0,11 | ns |
| C22:6 n3c | 0,00 | 0,00 | ns |
| AG Saturados | 71,94 | 71,82 | ns |
| AG Poliinsaturados | 4,29 | 3,32 | <0,0001 |
| AG omega-3 total | 1,14 | 0,74 | <0,0001 |
| AG omega-6 total | 2,31 | 1,82 | <0,0001 |
| Relación omega-6/omega-3 | 2,08 | 2,52 | <0,0001 |

En un meta análisis de datos de alimentación de vacuno con forrajes, Lourenço *et al.* (2008) indican que la mayor riqueza en AG omega 3 de la leche de vacas que consumen

trébol violeta se debe, fundamentalmente, a una menor tasa de biohidrogenación ruminal en dichas dietas, en las que suele observarse un aumento del flujo duodenal de α -linolénico y de CLA. Esta circunstancia se atribuye a la presencia en el trébol violeta de la enzima polifenol-oxidasa, capaz de reducir los fenómenos de lipólisis y posterior biohidrogenación en el rumen (Merry *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007) y de aumentar, por tanto, la presencia de AG poliinsaturados en la leche. Como vimos en nuestro ensayo, es el raigrás inglés y no el trébol violeta el que muestra una mayor concentración de omega-3 en la materia seca, siendo por el contrario superior su presencia en la leche producida con trébol violeta. Aunque no se midió la ingesta de pasto por parte de las vacas, cabe suponer de la mayor producción de leche observada para el trébol violeta que el consumo de materia seca de trébol violeta fue superior a la del raigrás, en consonancia con el superior valor nutricional y menor contenido en pared celular de aquel. En opinión de Vanhatalo *et al.* (2007) la mayor concentración en la grasa de la leche de AG poliinsaturados en las dietas con trébol violeta cabe ser atribuida a la mayor tasa de paso de las leguminosas por el rumen comparadas con las gramíneas, además de a la citada protección de la enzima polifenol-oxidasa.

Mientras que parece haber acuerdo acerca del aumento de la concentración de AG omega-3 en leche de vacas que consumen dietas de trébol violeta, parece menos claro el efecto que esta alimentación tiene sobre el contenido en CLA. Wu *et al.* (1997) observaron una mayor concentración de CLA en la leche de vacas que pastaron trébol violeta comparada con el pastoreo de gramíneas diversas, con valores medios de 1,4% y 0,9% de AG totales, respectivamente. Otros estudios no han encontrado diferencias, como es el caso del citado trabajo de Lee *et al.* (2009) donde el contenido en CLA de la leche de vacas que consumían trébol violeta y raigrás inglés era similar (1,06% AGT) y, en algunos casos, se ha asociado el consumo de trébol violeta con una reducción del contenido en CLA de la leche (Van Dorland *et al.*, 2008). Estos autores indican que, puesto que el CLA es un metabolito intermedio de la desaturación parcial del ácido linoleico, la protección ruminal de los AG poliinsaturados limitaría la producción de aquel en el rumen. Por otra parte, dicha protección reduciría también la disponibilidad de ácido vaccénico a partir de los AG α -linolénico y linoleico y por tanto la síntesis *ex novo* de CLA en la glándula mamaria mediante la desaturación enzimática del vaccénico. En nuestro ensayo, sin embargo, se observó que el tratamiento de pastoreo de trébol violeta presentaba conjuntamente valores más elevados de AG omega-3 y de CLA que el de raigrás, coincidiendo también con un mayor contenido en AG *trans*-C18:1 y que, conjuntamente, muestra un perfil de AG claramente más adecuado desde el punto de vista de la salud humana.

CONCLUSIÓN

Los resultados del ensayo prueban que es posible extender la estación de pastoreo a los meses centrales del verano y producir leche enriquecida en AG poliinsaturados y omega-3 con pastos de trébol violeta, aún en un estado fenológico avanzado, suplementando de forma económica al pasto con una dieta *unifeed* a base de ensilado de maíz y una baja proporción de concentrado. Estos resultados muestran que el trébol violeta puede ser un cultivo forrajero interesante para extender la estación de pastoreo en la zona costera de Galicia durante el verano en los sistemas de producción de leche de calidad diferenciada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R.H.; MCGOWAN, M., 1969. The routine determination of in vitro digestibility of organic matter in forages. *Journal of the British Grassland Society*, **21**, 140-147.
- ANSES, 2011. *Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras*. Rapport d'expertise collective. Mai 2011 Édition scientifique 323 pages. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Maisons-Alfort Cedex (France) Accesible en internet en: <http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>
- AOAC, 2003. Official Method 2003.06 Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages *Journal of AOAC International*, **86**, 888(2003); 899(2003).
- ARVIDSSON, K; GUSTAVSSON, A.M.; MARTINSSON, K. 2009. Fatty acids in forages: A comparison of different pre-treatments prior to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, **151**, 143–152.
- BROWN, H.E.; MOOT, D.J.; POLLOCK, K.M., 2005. Herbage production, persistence, nutritive characteristics and water use of perennial forages grown over 6 years on a Wakanui silt loam. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **48**, 423-439.
- CASTRO, P., 2000. Determinación de carbohidratos no estructurales en forrajes. *III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*, 447-453. Bragança-A Coruña-Lugo, 7-13 mayo 2000.
- CASTRO, P.; GONZALEZ-QUINTELA, A.; PRADA-RODRÍGUEZ, D., 1990. Determinación simultánea de nitrógeno y fósforo en muestras de pradera. *Actas de la XXX Reunión Científica de la SEEP*, 200-207. San Sebastián.
- DELABY, L.; RULQUIN, H.; PEYRAUD, J.L., 2002. Influence de quelques facteurs zootechniques sur la composition en acides gras du lait de vaches au pâturage. *Rencontres Recherches Ruminants*, **9**, 364.
- DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D.; LEE, M.R.F.; OUGHAM, H.J.; HUMPHREYS, M.O., 2003a. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proceedings of the Nutrition Society*, **62**, 329–336.
- DEWHURST, R.J.; FISHER, W.J.; TWEED, J.K.S.; WILKINS, R.J., 2003b. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1: Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science*, **86**, 2598–2611.
- DEWHURST, R. J.; SHINGFIELD, K. J.; LEE, M. R. F.; 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
- DHIMAN, T. R.; ANAND, G.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W., 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2146–2156

- ELGERSMA, A.; TAMMIGA, S.; ELLEN, G., 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, **131**, 207–225
- FERGUSON, J.D., 2000. *Milk Urea Nitrogen*. University of Pennsylvania. School of Veterinary Medicine. Center For Animal Health and Productivity. 382 West Street Road, Kennett Square, PA 19348-1692 USA. Accessible en internet en: <http://research.vet.upenn.edu/DairyPoultrySwine/DairyCattle/MUN/MilkUreaNitrogen/tabid/1596/Default.aspx>
- FERLAY A., MARTIN B., PRADEL P., COULON J.B., CHILLIARD Y., 2006. Influence of Grass-Based Diets on Milk Fatty Acid Composition and Milk Lipolytic System in Tarentaise and Montbéliarde Cow Breeds. *Journal of Dairy Science*, **89** (10), 4026-4041.
- FIELD, C.J.; BLEWETT, H.H.; PROCTOR, S.; VINE, D., 2009. Human health benefits of vaccenic acid. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **34**, 979–991.
- FORD, J.L.; BARRETT, B.A., 2011. Improving red clover persistence under grazing. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, **73**, 119-124.
- GIVENS, D. I.; SHINGFIELD, K. J., 2006. Optimising dairy milk fatty acid composition. En: *Improving the Fat Content of Foods*, C.WILLIAMS, J. BUTTRISS (Eds.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge (UK), 252–280.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J., 1970. Forage fiber analyses. *U.S.D.A. Agriculture Handbook*, 379, 1-12.
- GRUMMER, R., 1991. Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, **74**, 3244-3257.
- HARVATINE, K.J.; BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E., 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, **3** (1), 40–54.
- HUGHES, C. L.; DHIMAN, T. R., 2002. Dietary compounds in relation to dietary diversity and human health. *Journal of Medicinal Food*, **5**, 51–68.
- HUTJENS, F.M., 2006. *Feed Efficiency and Its Impact on Feed Intake*. Factsheet of the Feed Management Education Project. USDA-NRCS-CIG. Accesible en internet en: <http://www.puyallup.wsu.edu/dairy/nutrient-management/data/publications/DairyFeedEfficiencyfinal.pdf>
- KAY, J.K. ; ROCHE, J.R. ; KOLVER, E.S. ; THOMSON, N.A. ; BAUMGARD, L.H., 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, **72** (3), 322-332.
- LAW, R. A.; YOUNG, F. J.; PATTERSON, D. C.; KILPATRICK, D. J.; WYLIE, A. R. G.; MAYNE, C. S., 2009. Effect of dietary protein content on the fertility of dairy cows during early and mid lactation. *Journal of Dairy Science*, **92**, 2737–2746
- LEE, M.R.F.; PARFITT, L.J.; SCOLLAN, N.D.; MINCHIN, F.R., 2007. Lipolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities in the presence and absence of rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 1308–1314
- LEE, M. R. F.; THEOBALD, V. J.; TWEED, J. K. S.; WINTERS, A. L.; SCOLLAN, N. D., 2009. Effect of feeding fresh or conditioned red clover on milk fatty acids and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **92**, 1136-1147.
- LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C., 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science*, **74**, 163–176
- LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E., 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, **39**, 1197–1206.
- LOCK, A.L.; SHINGFIELD, K.L., 2004. Optimising milk composition. En: *Dairying-Using Science to Meet Consumer's Needs*, E. KEBREAB *et al.* (Eds.). British Society of Animal Science, Publication 29. Nottingham University Press. Loughborough (UK) 2004, 107-188

- LOURENÇO, M.; VAN RANST, G.; VLAEMINCK, B.; DE SMET, S.; FIEVEZ, V., 2008. Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Animal Feed Science and Technology*, **145**, 418-437.
- MERRY, R.J.; LEE, M.R.F.; DAVIES, D.R.; DEWHURST, R.J.; MOORBY, J.M.; SCOLLAN, N.D.; THEODOROU, M.K., 2006. Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. In vitro and in vivo studies of nitrogen utilization. *Journal of Animal Science*, **84**, 3049-3060.
- PACCARD, P.; CHENAIS, F.; BRUNSCHWIG, P., 2006. *Maîtrise de la matière grasse du lait par l'alimentation de vaches laitières*. Institut de l'Élevage. Collection Résultats. Juillet 2006, 36 pp.
- PARIZA, M. W., 1999. The biological activities of conjugated linoleic acid. En: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. I, I. M. P. YURAWECZ *et al.* (Eds.). AOCS Press, Champaign, IL, 12-20
- PARODI, P. W., 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, **82**, 1339-1349.
- PIÑEIRO, J., 2002. Situación e importancia de prados y praderas en Galicia. *Vida Rural*, nº **143**, Febrero 2002, 26-30.
- PIÑEIRO, J.; CASTRO-INSUA, J.; BLÁZQUEZ, R., 2009. Adubado de forraxeiras e pratenses. *Cooperación, Revista da Asociación Galega de Cooperativas Agrarias*, **92**. Cadernillo de divulgación técnica, 15 pp.
- SAS INSTITUTE, 2002-2008. SAS/Stat User's Guide, V. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC (EEUU).
- SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V.; KAIRENIUS, P.; GIVENS, D.I., 2008. Trans Fatty Acids and Bioactive Lipids in Ruminant Milk. En: *Bioactive Components of Milk*, ZSUZSANNA BÖSZE (Ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **606**, 3-65, Springer 2008.
- SMITH, R., 2000. Red clover in the twenty-first century. Accesible en internet en: http://www.uwex.edu/ces/forage/wfc/proceedings2000/smith.htm#_ftn1#_ftn1
- SULLIVAN, M.L.; HATFIELD, R.D., 2006. Polyphenol oxidase and o-diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science*, **46**, 662-670.
- SUKHIJA, S. Y PALMQUIST, D. L., 1988. Rapid Method for Determination of Total Fatty Acid Content and Composition of Feedstuffs and Feces. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **36**, 1202-1206.
- TOLEDANO-DÍAZ, M.G., 2001. *Ingesta de ácidos grasos "trans" vía dieta total del conjunto de la población española y de cuatro comunidades autónomas: Andalucía, Galicia, Madrid y Valencia*. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España. 129 pp.
- TRICON, S.; BURDGE, G. C.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. M.; YAQOOB, P., 2005. The effects of conjugated linoleic acid on human-health outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*, **64**, 171-182.
- TURPEINEN, A.M.; MUTANEN, M.; ARO, A.; SALMINEN, I.; BASU, S.; PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M., 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 504-510.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, **74**, 3583-3597
- VAN DORLAND, H. A.; KREUZER, M.; LEUENBERGER, H.; WETTSTEIN, H.-R., 2008. Comparative potential of white and red clover to modify the milk fatty acid profile of cows fed ryegrass-based diets from zero-grazing and silage systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**, 77-85
- VANHATALO, A.; KUOPPALA, K.; TOIVONEN, V.; SHINGFIELD, K. J., 2007. Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 856-867.

- VÁZQUEZ-YÁÑEZ, O.P.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; LÓPEZ-DÍAZ, J., 2005. Descripción de la evolución de la altura y producción de una pradera durante el pastoreo de primavera con vacas de leche. En: *Producciones agroganaderas. Gestión eficiente y conservación del medio natural*, Vol I, B. de la ROZA DELGADO *et al.* (Eds.). Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Villaviciosa (Asturias), 191-198.
- WAHLE, K. W. ; HEYS, S. D.; ROTONDO, D., 2004. Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, **43**, 553–587.
- WHO, 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/ FAO Expert Consultation. *WHO Technical Report Series 916*. Geneva (Suiza).
- WILKINS, R.J.; JONES, R., 2000. Alternative home-grown protein sources for ruminants in the United Kingdom. *Animal Feed Science and Technology*, **85**, 23-32.
- WU, Z.; SATTER, L.D.; KANNEGANTI, V.R.; PARIZA M.W., 1997. *Paddocks Containing Red Clover Compared to All Grass Paddocks Support High CLA Levels in Milk*. US Dairy Forage Research Center. Wisconsin University. Accesible en internet en: http://www.dfrc.wisc.edu/RS97_pdfs/FU11.pdf
- YAQOOB, P.; TRICON, S.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C., 2006. Conjugated linoleic acids (CLAs) and health. En: *Improving the Fat Content of Foods*. C. Williams, J. Buttriss (Eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge (Reino Unido), 182–209.

EFFECT OF RED CLOVER SUMMER GRAZING ON DAIRY MILK OMEGA-3 CONTENT

SUMMARY

An experiment was conducted to compare the effects of summer grazing of red clover and perennial ryegrass pastures by dairy cows on animal performance and fatty acid (FA) composition of milk. Weather was dry and warm along the experimental period (25th July – 26th September 2010). Pasture quality decreased with the advance of grazing season for both treatments but red clover showed an overall better quality, with higher average values for organic matter digestibility (+4%) and crude protein (+47%) and lower neutral detergent fiber content (-35%) compared with the ryegrass. The FA profile for both pasture species was predominantly unsaturated, accounting the alpha-linolenic acid for the 55.8% and the 63.8% of total forage FA in red clover and ryegrass, respectively. Dairy cow yields of milk, milk fat, milk protein and milk solids-not-fat were higher (+12.3%; +13.4%; +11.7% and +11.5%, respectively) for the cows in the red clover treatment, but milk contents of fat, protein, lactose and solids-not-fat were not affected by pasture type. Red clover grazing increased cow milk fat in alpha-linolenic acid (+69.0%), total *trans* C18:1 (+191%), total polyunsaturated (+29.2%) and total omega-3 (+54.0%) FA content, whilst omega-6/omega-3 ratio was reduced (-17.5%) compared with ryegrass. It is concluded that red clover can be useful for extending the grazing season in Galicia over the summer and produce a healthier milk according with actual consumer demands.

Key words: Forage legumes, dairy cows, milk yield, milk fat composition.