

EFFECTO DE LA AUSENCIA DE PROTOZOOS SOBRE LA HIDROGENACIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO EN EL RUMEN DE CORDEROS

Yáñez-Ruiz¹, D.R., Martín-García², A.I. Belanche³, A., Hart.¹ K.J., Newbold¹, C.J.

¹Institute of Rural Sciences, University of Wales, SY23 3AL, Aberystwyth, Reino Unido

²Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 18008, Granada

³Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza. E-mail: dyy@aber.ac.uk

INTRODUCCION

Los productos alimenticios derivados del rumiante representan la mayor fuente de ácido linoleico conjugado (CLA) en la alimentación humana. Algunos isómeros de CLA se han asociado con diversas propiedades ventajosas para la salud del consumidor, como la inhibición de ciertos tipos de cáncer, la disminución de la arteriosclerosis y el estímulo de la respuesta inmune. El isómero más abundante de CLA (C18:2, *cis*-9, *trans*-11) llega al tejido animal bien directamente como consecuencia de la hidrogenación de ácido linoleico (AL) llevada a cabo por parte de la población microbiana ruminal o mediante la desaturación de ácido vaccénico (AV, C18:1, *trans*-11), otro isómero sintetizado en el rumen a partir de AL.

Recientemente, se ha observado que los protozoos ruminales poseen mayores cantidades de CLA y AV que las bacterias (Devillard *et al.*, 2006), y que representan una contribución muy significativa (40 %) al flujo duodenal de estos compuestos (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006). Sin embargo, los estudios que han analizado el efecto de la ausencia de protozoos sobre el metabolismo lipídico en el rumen son contradictorios y han sido realizados antes de haberse suscitado interés científico sobre el metabolismo de CLA y AV. En este sentido, resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007) muestran una mayor producción de CLA y menor hidrogenación de ácidos grasos insaturados en corderos libres de protozoos en comparación con animales faunados, cuando ambos grupos fueron alimentados a base de pasto. Sin embargo, se desconoce que ocurre en animales alimentados a base de dietas con una alta proporción de concentrado.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la ausencia de protozoos en el rumen de corderos alimentados con una elevada proporción de concentrado sobre la composición del flujo en ácidos de grasos al duodeno y la cinética de hidrogenación de ácido linoleico *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 12 corderos que fueron separados de las madres a las 24 horas del nacimiento y se mantuvieron durante todo el periodo de lactancia artificial (8 semanas) aislados de cualquier contacto con animales adultos. Tras el destete se separaron aleatoriamente en dos grupos de 6 animales cada uno. En uno de los grupos (grupo faunados, F), a cada animal se suministró por vía oral 5 ml de líquido ruminal recién extraído de ovejas adultas. El mismo tipo de líquido ruminal suministrado al grupo F se centrifugó a 1,000 x g durante 10 minutos. Para garantizar la destrucción de las células protozoarias, la fracción sobrenadante fue congelada durante 12 h, descongelada y homogeneizada y una alícuota de 5 ml fue suministrada a cada animal del segundo grupo (grupo libre de protozoos, LP). Ambos grupos fueron alimentados durante 3 meses a base de concentrado comercial para corderos (Wynnstay plc, Reino Unido) y heno de hierba, ambos *ad libitum*. Posteriormente, durante el mes previo al sacrificio, ambos grupos fueron alimentados en dos tomas iguales cada día con una dieta a base del mismo concentrado y heno de hierba (75:25) para cubrir 1,2 veces sus necesidades de mantenimiento.

Tras el sacrificio, se recogieron muestras de digesta del abomaso, se congelaron a -20°C y se liofilizaron para determinar su contenido en ácidos grasos. Igualmente, 2,5 ml de contenido ruminal de cada animal fueron incubados por duplicado, a 39 °C durante 0, 3 y 6 horas, en tubos de cultivo a los que se adicionaron 0,5 (-) o 2 µl (+) de AL (C18:2, *cis*9, *cis*12). Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, se adicionaron 1,5 ml de una solución de ácido fosfórico 1 M a cada tubo, como fijador, y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis en ácidos grasos.

El perfil de ácidos grasos fue determinado mediante cromatografía de gases, empleando ácido heneicosanoico (C21:0) como estándar interno y una columna Varian (100 m x 0,25 mm, EEUU) siguiendo la metodología descrita por Kramer y Zhou (2001). Los distintos ácidos grasos se identificaron en los cromatogramas empleando una mezcla de estándares externos (FAME mix Supelco, Reino Unido) y de isómeros de CLA (Matreya, EEUU).

El efecto de la ausencia de protozoos sobre la composición de ácidos grasos se realizó mediante análisis de varianza de una vía empleando el paquete estadístico Genstat 7 (Lawes Agricultural Trust, Reino Unido). El efecto de la ausencia de protozoos y de la concentración de AL sobre la hidrogenación *in vitro* a cada hora de incubación se realizó mediante análisis de varianza de dos vías con muestras duplicadas (Genstat 7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales pertenecientes al grupo LP permanecieron libres de protozoos durante el desarrollo del experimento. El contenido ruminal de estos animales fue examinado tras el sacrificio y no se detectó ninguna célula protozoaria. Por el contrario, el contenido ruminal de los animales en el grupo F presentó concentraciones de protozoos en el rango habitual en que un animal es faunado de manera natural (10^5 - 10^6 células por mililitro).

En el experimento *in vitro* se empleó contenido ruminal en lugar de sólo líquido ruminal filtrado debido a las diferencias que existen en los patrones de biohidrogenación entre distintas fracciones en el rumen (Dorel *et al.*, 2005).

En la Tabla 1 se presenta la velocidad a la que el AL fue hidrogenado en los intervalos 0-3 horas y 0-6 horas. Durante las tres primeras horas de incubación la aparición de C18:0 fue mayor ($P < 0,001$) en los tubos inoculados con la concentración más alta de AL, lo que coincide con una tendencia ($P = 0,073$) a hidrogenar C18:2 más rápidamente. Se observó una interacción significativa ($P = 0,006$) en la síntesis de C18:0 entre el efecto de la ausencia de protozoos y la concentración de AL añadido, ya que el incremento de la velocidad de hidrogenación es más evidente en el grupo LP que en el grupo F. Esto puede ser explicado por la alta sensibilidad que los protozoos tienen a altas concentraciones de AL (Ivan *et al.*, 2001).

Esta diferencia entre el grupo LP y F desaparece cuando se considera el período de 0 a 6 horas de incubación, lo que sugiere que tras un tiempo de adaptación en el que se elimina parte del AL, la población microbiana presente en animales con protozoos no se ve afectada por un aporte de 2 μ l de AL. Sin embargo, el cálculo de la velocidad de hidrogenación de AL a lo largo de 6 horas mostró valores más elevados ($P = 0,003$) de producción de ácido esteárico en el contenido ruminal de animales faunados, lo que de nuevo corresponde con una desaparición de AL mayor en el grupo F en comparación con LP.

En cuanto al AV, principal fuente de síntesis de CLA-c9,t11 en el tejido animal, se observó una mayor velocidad de síntesis tras el período de 6 horas en el grupo + en comparación con el grupo -.

La digesta recogida en abomaso presentó valores muy similares en la proporción de los distintos ácidos grasos analizados entre ambos grupos experimentales (Tabla 2). Se observó una tendencia hacia mayores ($P = 0,075$) valores de C18:0 y menores de C18:2 ($P = 0,094$) en animales faunados en comparación con aquellos libres de protozoos, lo que indica que la hidrogenación de AL es mayor en el rumen de estos animales, coincidiendo con los valores obtenidos en las incubaciones *in vitro*. Estos resultados son contrarios a los observados en nuestro laboratorio entre animales faunados y libres de protozoos alimentados a base de pasto (Yáñez Ruiz *et al.*, 2007).

Por otro lado, los dos isómeros de CLA analizados en este trabajo se encontraron en proporciones más elevadas en la digesta de animales faunados lo que coincide con valores observados *in vitro* por Devillard *et al.* (2006), que obtuvieron el inóculo ruminal de animales alimentados con una dieta similar a la empleada en este experimento.

Los resultados obtenidos indican que el efecto de la ausencia de protozoos en el rumen sobre la hidrogenación de ácido linoleico depende del tipo de dieta que se suministre

al animal. Con dietas con alto contenido en concentrado se produce una mayor hidrogenación de ácido linoleico en animales libres de protozoos y una mayor producción de ácido vaccénico que en animales faunados. Sin embargo, la producción de CLA es más elevada cuando no existen protozoos en el rumen. Estos resultados deben ser contrastados con el análisis del contenido en ácidos grasos de la grasa de tejidos en animales de ambos grupos experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Devillard E, McIntosh FM, Newbold CJ, Wallace J. 2006. *Br J Nutr* 96, 697-704.
 Dorel A, Scollan ND, Lee MRF, Yáñez-Ruiz DR, Newbold. 2006. Proceedings of the BSAS 2005, p 202. ISBN0906526 47 3.
 Yáñez-Ruiz DR, Scollan ND, Merry RJ, Newbold CJ. 2006. *Br J Nutr* 96, 861-869.
 Yáñez-Ruiz DR, Williams S, Newbold CJ. 2007. *Br J Nut* (en prensa).
 Ivan M, Mir PS, Koenig KM, Rode LD, Neil L, Mir Z. 2001. *Small Ruminant Res* 41, 215-222
 Kramer JKG, Zhou JQ. 2001. *Eur Lipid Sc Technol* 103, 594-600.

Tabla 1. Efecto de la ausencia de protozoos (LP: libre de protozoos, F: faunados) y de la concentración de ácido linoleico (+:2 μ l, -:0,5 μ l) sobre la aparición (mg/ml/h) de ácido esteárico (C18:0) y AV (C18:1,*t*11) y la desaparición (mg/ml/h) de ácido linoleico (C18:2*c*9-*c*12) sobre 3 y 6 horas de incubación *in vitro*.

	Tratamiento experimental				eed ¹	Probabilidad ²		
	LP-	LP+	F-	F+		P	AL	P * AL
0 a 3 h								
C18:0	0,051	0,401	0,104	0,245	0,0239	0,145	<0,001	0,006
C18:1- <i>t</i> 11	0,010	0,014	0,013	0,017	0,0050	0,618	0,541	0,994
C18:2	0,119	0,349	0,170	0,195	0,0477	0,458	0,073	0,144
0 a 6 h								
C18:0	0,236	0,254	0,379	0,336	0,0024	0,003	0,708	0,373
C18:1- <i>t</i> 11	0,006	0,019	0,005	0,019	0,0050	0,868	0,051	0,949
C18:2	0,070	0,260	0,150	0,246	0,0141	0,114	<0,001	0,005

¹eed: error estándar de la diferencia

²P: efecto de la ausencia de protozoos; AL: efecto de la adición de ácido linoleico.

Tabla 2. Efecto de la ausencia de protozoos (LP: libre de protozoos, F: faunados) sobre la composición en ácidos grasos (mg/100 mg ácidos grasos totales) de la digesta en abomaso.

Ácido graso	Tratamiento experimental		eed ¹	Probabilidad
	LP	F		
C12:0	4,48	3,07	0,715	0,076
C14:0	3,97	3,44	0,399	0,218
C14:1	1,47	1,89	0,195	0,056
C15:0	0,85	0,91	0,208	0,746
C16:0	22,5	25,3	2,71	0,330
C18:0	39,0	48,4	4,63	0,075
C18:1- <i>t</i> 11	2,60	4,21	1,397	0,279
C18:1- <i>c</i> 9	8,06	6,97	1,027	0,314
C18:2- <i>c</i> 9, <i>c</i> 12	8,40	6,02	1,362	0,094
C18:2- <i>c</i> 9, <i>t</i> 11	1,55	0,84	0,415	0,115
C18:2- <i>t</i> 10, <i>c</i> 12	0,45	0,36	0,192	0,628

¹eed: error estándar de la diferencia