

ESTRATEGIAS PARA MODIFICAR LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN DIETAS RICAS EN OMEGA-3

A. Siurana^a, A. Ferret^a, D. Bravo^b, S. Calsamiglia^a. ^aUniversitat Autònoma de Barcelona, Spain; ^bPancosma, Switzerland

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. sergio.calsamiglia@uab.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha desarrollado un interés creciente en la producción de leche enriquecida con ácidos grasos omega-3 y ácido linoleico conjugado (CLA). En condiciones naturales, casi todo el CLA se produce a partir de los intermediarios de la biohidrogenación de las grasas poliinsaturadas en el rumen. Por esta razón, el aporte de CLA en la dieta humana proviene mayoritariamente del consumo de productos lácteos y cárnicos derivados de rumiantes (Ritzenthaler *et al.*, 2001). En el rumen ocurren dos procesos en el metabolismo de los lípidos: la hidrólisis de los enlaces éster mediante lipasas microbianas (o lipólisis) (Dawson *et al.*, 1977) y la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados (AGI). La adición de aceites vegetales ricos en ácido linoleico y linolénico a la dieta de rumiantes resulta en la acumulación de ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1) y la posterior desaturación del ácido vaccénico a *cis*-9, *trans*-11 CLA en la glándula mamaria mediante el enzima delta-9 desaturasa. Esta síntesis endógena en la glándula mamaria es la mayor fuente de CLA en la leche. Sin embargo, bajo ciertas condiciones dietarias, como dietas suplementadas con aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados y un pH ruminal bajo, las vías de la biohidrogenación ruminal se alteran y se producen ácidos grasos intermediarios, de los cuales algunos son potentes inhibidores de la síntesis de la grasa láctea (Bauman y Griinari, 2001). Esta depresión de la grasa láctea se ha relacionado sobre todo con el incremento del isómero *trans*-10 C18:1 en el rumen, y *trans*-10, *cis*-12 CLA en el rumen y en la glándula mamaria. Esta reducción de la grasa láctea tiene implicaciones económicas importantes en las explotaciones lecheras y en la planificación de la comercialización de leche enriquecida con omega-3 y CLA, ya que puede comprometer la normativa de garantías de composición grasa mínima de dicha leche.

El objetivo general de este proyecto es evaluar estrategias nutricionales para desarrollar una leche enriquecida en CLA minimizando la reducción del contenido en grasa láctea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron las siguientes 3 estrategias en 2 experimentos: 1) Estimular la lipólisis con el objetivo de aumentar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados disponibles para la biohidrogenación bajo la hipótesis que éste incremento puede saturar la actividad microbiana ruminal encargada de la biohidrogenación e inhibir los pasos intermediarios de la biohidrogenación (Lourenço *et al.*, 2010). En consecuencia, se espera un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados intermediarios, especialmente en el *trans*-11 C18:1. Para ello se utilizaron dos lipasas (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark); 2) Inhibir la lipólisis con el objetivo de observar qué cambios se producen en los intermediarios de la biohidrogenación, y su posible potencial para disminuir la completa saturación de los ácidos linoleico y linolénico. Para alcanzar este objetivo se probó un inhibidor de la enzima lipasa pancreática. 3) Limitar la acción microbiana del último paso de la biohidrogenación (saturación del *trans*-11 C18:1 a C18:0) y evitar el desarrollo de la vía metabólica alternativa que produce *trans*-10 C18:1. Para este objetivo se utilizaron tres aceites esenciales, los cuales tienen actividad antimicrobiana (Pancosma S. A., Geneva, Switzerland).

En el primer experimento, se estudiaron los aditivos señalados anteriormente mediante la técnica de digestibilidad "in vitro" Tilley-Terry (1963). Se utilizó una dieta 50:50 forraje:concentrado enriquecida con aceite de lino como fuente de ácidos grasos omega-3 (8,3%MS). Los tratamientos fueron control; lipasa 1 y 2 (0,4 y 4 µl/g MS); inhibidor de la lipasa pancreática (0,4 y 2 mg/g MS); Oxy-propyl-tiosulfato (PTSO) (60 y 120 mg/l); Eugenol (EUG) y Cinamaldehido (CIN) (150 y 500 ml/l). Los tratamientos se probaron a dos niveles de pH (6,4 y 5,6) durante 2h (lipasas e inhibidor de la lipasa pancreática) o 6h (aceites esenciales) y se realizaron 2 periodos experimentales. Pasadas las horas de incubación se determinó el pH final y se recogieron muestras para determinar el Nitrógeno amoniacal, los ácidos grasos volátiles (AGV) y el perfil de ácidos grasos de cadena larga.

En el segundo experimento, se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo (1320 ml) en 3 periodos experimentales (5 días de adaptación y 3 días de muestreo) para estudiar los efectos de la lipasa 1, el PTSO y el CIN en la biohidrogenación de los ácidos LA y LNA, y la fermentación ruminal. Los fermentadores se alimentaron con 95 g/d de MS de una dieta 60:40 forraje:concentrado enriquecida con aceite de lino como fuente de omega-3 (5% MS). Los tratamientos fueron control, lipasa 1 (4µl/l), PTSO (90 mg/l) y CIN (250 mg/l) a dos niveles de pH (6,4 y 5,6). Durante los últimos 3 días de cada periodo, se recogieron muestras a las 0, 3 y 6 h después de la comida de la mañana para analizar el perfil de ácidos grasos de cadena larga. A las 0 y 3 h después de la comida de la mañana se recogieron muestras para determinar el Nitrógeno amoniacal y los AGV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer experimento, la lipasa 1, independientemente del pH y la dosis, incrementó la biohidrogenación aparente del LNA (pH 6.4: 45.3 vs. 20.4; pH 5.6: 32.9 vs.19.6, respectivamente) y disminuyó la eficiencia de los pasos intermediarios de la biohidrogenación del LA y LNA. La lipasa 2 incrementó la biohidrogenación aparente del LNA a pH 6,4 (33.9 vs. 20.4). No se observó ningún efecto con el inhibidor de la lipasa pancreática sobre la biohidrogenación. El tratamiento PTSO inhibió la biohidrogenación aparente del LA y LNA a los 2 niveles de pH. El tratamiento EUG, a la dosis de 150 mg/l, incrementó la concentración de *cis*-9, *trans*-11 CLA a pH 6,4. El tratamiento CIN, a la dosis de 500 mg/l, inhibió la biohidrogenación aparente del LNA a los dos niveles de pH. Después de 6 h de incubación, el pH 5,6 disminuyó la concentración total de AGV. Además, a pH 6,4 el tratamiento PTSO, a las 2 dosis, y CIN, a dosis alta, disminuyeron la concentración total de AGV; y a pH 5,6, los tratamientos PTSO y CIN, a las dos dosis, y EUG, a dosis alta, disminuyeron la concentración total de AGV. En el segundo experimento, el tratamiento PTSO inhibió la concentración aparente del LA y LNA, y disminuyó la concentración total de AGV a los dos niveles de pH. El pH bajo (5,6) inhibió la biohidrogenación del LA, incrementó la concentración del isómero *trans*-10 C18:1 y disminuyó la concentración total de AGV.

Los efectos más importantes de disminuir el pH fueron la reducción de los ácidos *trans*-11 C18:1 y *cis*-9, *trans*-11 CLA pero no los ácidos *trans*-10 C18:1 y *trans*-10, *cis*-12 CLA que, además, en el experimento 2 aumentaron. Por lo tanto, con un pH bajo, que podemos encontrar en granjas con producción intensiva, incrementa la actividad de la vía alternativa de la biohidrogenación ruminal que podría provocar la inhibición de la síntesis de la grasa láctea. Además, la fermentación ruminal también se vió afectada, ya que se observó una disminución de los AGV totales, aunque este efecto no se observó en el experimento 1 en los tratamientos que sólo fueron incubados durante 2 horas. Esto demuestra que los efectos de la reducción del pH aumentan cuanto más largo es el tiempo de incubación. Los efectos negativos del pH sobre los intermediarios de la biohidrogenación y AGV también fueron observados por Fuentes *et al.* (2009; 2011).

Los resultados indicaron que la lipasa 1 aumentó la biohidrogenación aparente del ácido linoleico y linolénico por lo cual en el perfil final de los ácidos grasos se observa una disminución de los ácidos linoleico y linolénico, y un aumento del ácido esteárico (C18:0). El incremento de la actividad lipolítica produce un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados disponibles para la biohidrogenación a las 2 horas de incubación. Este incremento puede saturar la actividad microbiana ruminal encargada de la biohidrogenación e inhibir los pasos intermediarios de la biohidrogenación (Lourenço *et al.*, 2010). Por lo tanto hay un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados intermediarios. Incrementar la actividad lipolítica puede aumentar el flujo de *trans*-11 C18:1 y *cis*-9, *trans*-11 CLA desde el rumen a la glándula mamaria y, consecuentemente, aumentar la concentración de *cis*-9, *trans*-11 CLA en la grasa láctea y obtener una leche enriquecida en CLA, pero no disminuye los isómeros *trans*-10 y *trans*-10, *cis*-12 CLA, por lo que el objetivo de evitar la disminución de la síntesis de grasa láctea es improbable. Además, estos efectos no se demostraron en el experimento 2, lo que nos sugiere que las poblaciones microbianas se adaptaron a la acción de las lipasas.

En el caso de los aceites esenciales, incluir CIN y PTSO en la dieta inhibió la biohidrogenación del LNA, lo que podría incrementar el flujo duodenal de ácidos grasos omega-3 y disminuir el flujo de ácido esteárico (C18:0) hacia la glándula mamaria, por lo que se podría obtener una leche enriquecida con ácidos grasos omega-3 y menos grasas saturadas, pero no se evitaría la depresión de la síntesis de la grasa láctea. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Lourenço *et al.* (2008), donde se

observó que incluir cinamaldehído a dosis de 500 mg/l inhibía la biohidrogenación aparente del ácido linoleico y linoléico. Por otro lado, en el experimento 2 no se observó ningún efecto en el perfil de ácidos grasos a causa de la adición de cinamaldehído, lo que coincide con Benchaar y Chouinard (2009) que probaron dosis de 1 g/d en vacas de raza Holstein. Por otro lado, estos dos tratamientos provocaron una disminución de los AGV, lo que sugiere que a las dosis utilizadas afectaron a la fermentación ruminal. Además, en el caso del PTSO, existe una interacción significativa entre el pH y tratamiento que provoca una disminución mayor de los AGV totales a pH 5,6 respecto a pH 6,4, por lo tanto los resultados observados cuando incluimos PTSO en la dieta deben atribuirse parcialmente al efecto del pH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauman, D.E., y J.M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.
- Benchaar, C., Chouinard, P.Y., 2009. Short communication: Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3392-3396.
- Dawson, R.M.C., N. Hemington, y G.P. Hazlewood. 1977. Role of higher plant and microbial lipases in ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br. J. Nutr.* 38:225-232.
- Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., Vlaeminck, B., 2009 Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous cultura. *J. Dairy Sci.* 92:4458-4466.
- Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., Mercadal, D., 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous cultura of ruminal fluid. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 169:35-45.
- Lourenço, M., Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Fievez, V., 2008. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 86:3045-3053.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4.7:1008-1023.
- Ritzenthaler, K.L., M.K. McGuire, R. Falen, T.D. Shultz, N. Dasgupta, y M.A. McGuire. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.* 131:1548-1554.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, v. 18, n. 2:104-111.

STRATEGIES TO MODIFY BIOHYDROGENATION PATHWAYS OF DIETS RICH IN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

ABSTRACT: Two experiments were conducted to determinate the effects of several commercial lipases and essential oils on apparent biohydrogenation of linoleic (LA) and linolenic (LNA) acids and rumen fermentation. In a first experiment, *in vitro* incubations (Tilley & Terry, 1963) at two pH levels (6.4 and 5.6) in two replicated periods were used. Treatments were control; lipase 1 and 2 (0.4 and 4 μ l/g DM); lipase inhibitor (0.4 and 2 mg/g DM); Oxy-propyl-thiosulphate (PTSO) (60 and 120 mg/l); Eugenol (EUG) and Cinnamaldehyde (CIN) (150 and 500 ml/l). In a second experiment, 8 dual-flow continuous culture fermenters (1,320 ml) were used in 3 replicated periods to study the effects of lipase 1 (4 μ l/l), PTSO (90 mg/l) and CIN (250 mg/l) at two pH levels (6.4 and 5.6). Lipase 1, independently pH level and doses, increased the apparent biohydrogenation of LNA in the first experiment, however these results were not observed in the second experiment. PTSO inhibited the apparent biohydrogenation of LA and LNA and decreased the total VFA concentration at the two pH. The low pH inhibited the biohydrogenation of LA, increased the *trans*-10 18:1 isomer, and decreased the total VFA concentrations. Results indicated that effects of lipases observed in the Tilley & Terry incubation were not observed in long term fermenters, which suggests that microbial population was adapted to lipases. Reducing the pH inhibited the ruminal fermentation and increased the alternative pathway of ruminal biohydrogenation.

Keywords: biohydrogenation, conjugated linoleic acid (CLA), fatty acid.