

EFFECTO DEL pH Y DEL NIVEL DE CONCENTRADO DE LA DIETA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS DE LA BIOHIDROGENACIÓN EN CULTIVO CONTINUO

M. C. Fuentes¹, S. Calsamiglia¹, y P.W. Cardozo¹
¹Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España
maricarmen.fuentes@uab.es

INTRODUCCIÓN

El síndrome de grasa baja se caracteriza por una reducción en el contenido graso y por la alteración en la composición de ácidos grasos (AG) de la leche, con mayores cantidades de AG *trans*-C_{18:1} y ácido linoleico conjugado (ALC), al alimentar a las vacas con ciertas dietas (Palmquist et al., 1993). Se han propuesto varias teorías para explicar el síndrome de baja grasa en vacas, pero la que ha recibido más apoyo en la última década sugiere que la síntesis de grasa láctea se inhibe por ciertos AG *trans* (*trans*-10 C_{18:1} y *trans*-10, *cis*-12 CLA) que se producen como resultado de alteraciones en el proceso de biohidrogenación ruminal de los AG insaturados al alimentar a las vacas con dietas ricas en concentrado (Bauman y Griinari, 2003). Como normalmente se observa una reducción en el pH ruminal al alimentar a las vacas con dietas ricas en concentrado, se desconoce cuál es la causa real (el nivel de concentrado, el pH ruminal o ambos) que provoca este cambio en el proceso de biohidrogenación ruminal. Es evidente que debe existir una interacción significativa entre el nivel de concentrado y el pH ruminal en la biohidrogenación de los AG insaturados. Sin embargo, no existe literatura disponible en la que ambos factores se hayan estudiado simultáneamente para estudiar su contribución al flujo de AG en un sistema continuo. Por tanto, se llevó a cabo un experimento para estudiar el efecto del pH y del nivel de concentrado de la dieta sobre la producción de intermediarios de la biohidrogenación en un sistema de doble flujo continuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo (Stern y Hoover, 1990) en dos períodos consecutivos de 8 días (5 d de adaptación y 3 d de muestreo). La temperatura (39°C) y la tasa de dilución sólida (5%/h) y líquida (10%/h) se mantuvieron constantes. El primer día de cada período los fermentadores se inocularon con líquido ruminal de una vaca canulada alimentada con una ración 60:40 forraje:concentrado (FC). Los tratamientos se organizaron en un diseño factorial 2 x 2, siendo los factores principales el pH (6,4 vs. 5,6) y la relación F:C de la dieta (baja en concentrado (BC) = 70:30 F:C vs. alta en concentrado (AC) = 30:70 F:C). Las dietas se diseñaron para ser isoproteicas (PB: 17,8%) y para aportar cantidades similares de AG totales (EE: 5,3%) y con una composición similar de ácido linoleico y linoléico (C_{18:2} y C_{18:3}). Se suministraron 95 g MS/d de las dietas dosificadas en tres veces al día a los fermentadores (0800, 1600, 2400). Durante los 3 días de muestreo a 1 hora post alimentación de la mañana se tomaron muestras del efluente para estudiar el perfil de AG. También se tomaron a las mismas horas muestras de líquido ruminal del fermentador para realizar técnicas de rt-PCR para estudiar cambios en las bacterias involucradas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal [*Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* subgrupo productor de ácido esteárico (*Butyrivibrio* subgrupo AS) y *Butyrivibrio fibrisolvens* subgrupo productor de ácido vaccénico (*Butyrivibrio* subgrupo AV)].

El diseño estadístico utilizado fue de bloques completos al azar con 4 tratamientos y 2 períodos, considerando el período como efecto bloque. Los resultados fueron analizados utilizando el programa PROC MIXED del SAS (V. 9.1, SAS Institute, Cary, NC). Las diferencias se declararon a P < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proporción de C_{18:0}, *trans*-11 C_{18:1} y *cis*-9, *trans*-11 ALC fue menor y la de *trans*-10 C_{18:1}, *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2} y *trans*-10, *cis*-12 ALC mayor a pH 5,6 que a

pH 6,4 (Tabla 1). El incremento en *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} y C_{18:3n-3} refleja la inhibición de la biohidrogenación aparente de *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6} y C_{18:3n-3} a pH bajo.

La proporción de *cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3} y *trans*-10, *cis*-12 ALC fue mayor, y la de *trans*-10 C_{18:1} y *trans*-11 C_{18:1} menor en la dieta AC que en la BC en el efluente de 1 h postalimentación (Tabla 1). Estos resultados sugieren que la biohidrogenación es más activa en la dieta BC que en la AC porque hay menos proporción de precursores de la biohidrogenación (*cis*-9 C_{18:1}, C_{18:2n-6}, C_{18:3n-3}) y más proporción de intermediarios de la biohidrogenación, sobretodo AG *trans*-C_{18:1}, en el efluente. La proporción de *trans*-10, *cis*-12 ALC fue mayor en la dieta AC que en la BC. Varios estudios han demostrado que incrementar los niveles de carbohidratos fácilmente digestibles en la dieta se ha asociado con mayores proporciones de *trans*-10, *cis*-12 ALC en la grasa de la leche (Kalscheur et al., 1997; Griinari et al., 1998; Piperova et al., 2000). Sin embargo, Griinari et al. (1998) y Kalscheur et al. (1997) observaron que las dietas ricas en concentrado se acompañaban de menores pH ruminales. Debido a que in vivo el cambio en pH ocurre como consecuencia de alimentar con dietas ricas en concentrado, en los resultados observados se confunden los efectos entre la acidosis ruminal y los efectos del nivel de concentrado en la dieta. Los resultados de este experimento indican que el pH es el factor principal que afecta el proceso de biohidrogenación ruminal y que resulta en la acumulación de *trans*-10, *cis*-12 ALC, sin embargo, la proporción de *trans*-10, *cis*-12 ALC en el efluente puede también estar afectada por altos niveles de concentrado en la dieta, pero en menor medida.

Hubo una interacción significativa entre dieta y pH en las concentraciones de DNA de *A. lipolytica* y *Butyrivibrio* subgrupo AV (Tabla 2). La concentración de DNA de *A. lipolytica* DNA se redujo a pH 5,6 en ambas dietas y su concentración a pH 6,4 fue mayor en la dieta AC que en la BC. La concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AV se redujo a pH 5,6 en ambas dietas pero esta reducción fue mayor en la dieta AC que en la BC y la concentración a pH 6,4 fue similar entre las dietas. Sorprendentemente, la concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AS tendió a ser mayor a pH 5,6 que a pH 6,4 (Tabla 2) a pesar de la importante reducción en la proporción de C_{18:0} en el efluente a 1 h postalimentación (Tabla 1). Esto podría sugerir que *Butyrivibrio* subgrupo SA esté solo jugando un papel menor en la producción total de C_{18:0} o que su actividad metabólica puede no ser proporcional a la concentración del gen 16S rRNA.

Tabla 1. Efecto del nivel de concentrado de la dieta (BC: 70:30 F:C, AC: 30:70 F:C) y del pH (6,4 vs. 5,6) sobre el perfil de ácidos grasos (g/100g C₁₈-AG) del efluente 1 h postalimentación.

	Dieta				ESM	P-valor		
	BC		AC			C	P	C × P
	6,4	5,6	6,4	5,6				
C _{18:0}	47,8	11,8	48,5	10,2	3,2	0,872	<0,001	0,683
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	1,82	27,1	0,35	18,3	2,9	0,027	<0,001	0,095
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	5,71	1,06	3,21	0,39	0,46	0,008	<0,001	0,085
C _{18:2n-6}	17,7	27,4	18,9	31,8	1,2	0,049	<0,001	0,229
C _{18:3n-3}	3,53	5,11	4,97	7,92	0,33	<0,001	<0,001	0,064
c9 C _{18:1}	14,1	20,6	15,8	24,9	0,74	0,012	<0,001	0,077
t11,c15 C _{18:2} ²	0,15	1,04	0,12	1,18	0,10	0,430	<0,001	0,268
c9,t11 ALC	0,11	0,03	0,07	0,004	0,024	0,175	0,005	0,693
t10,c12 ALC	0,14	0,47	0,17	0,60	0,033	0,022	<0,001	0,128

¹C = nivel de concentrado, P = pH, y C × P = interacción concentrado por pH.

² t11,c15 C_{18:2} = *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}; c9,t11 ALC = *cis*-9, *trans*-11 CLA; t10,c12 ALC = *trans*-10, *cis*-12 ALC.

Tabla 2. Efecto del nivel de concentrado de la dieta (BC: 70:30 F:C, AC: 30:70 F:C) y del pH (6,4 vs. 5,6) sobre la cuantificación (pg/10 ng DNA) de *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio subgrupos AS y AV* en los días 6 a 8 de muestreo.

	Dieta				ESM	P-valor		
	BC		AC			C	P	C × P
	6,4	5,6	6,4	5,6				
<i>A. lipolytica</i>	42,5 ^b	0,91 ^c	111,4 ^a	0,48 ^c	9,7	0,002	<0,001	0,002
<i>B. fibrisolvens</i> AV	1314 ^a	557,7 ^b	1378 ^a	111,5 ^c	114	0,086	<0,001	0,028
<i>B. fibrisolvens</i> AS	405,5	653,3	438,2	525,3	141	0,611	0,093	0,396

^{a,b,c} Cuando la interacción es significativa ($P < 0,05$), diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente.

¹C = nivel de concentrado, P = pH, y C × P = interacción concentrado por pH.

CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento confirman que es el pH, y no la cantidad de concentrado en la dieta, el principal factor que afecta al proceso de biohidrogenación ruminal que resulta en la acumulación de *trans*-10, *cis*-12 ALC, AG asociado con la reducción en el porcentaje de grasa láctea observado in vivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauman, D. E., y J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 23:203-227.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, y K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, y R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, y D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753-1771.
- Stern, M. D., y W. H. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in *Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation*. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
- Piperova, L. S., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritsche, K. Ku, y R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* 130:2658-2674.

EFFECT OF pH AND LEVEL OF CONCENTRATE IN THE DIET ON THE PRODUCTION OF BIOHYDROGENATION INTERMEDIATES IN A DUAL FLOW CONTINUOUS CULTURE

ABSTRACT: Milk fat depression in cows fed high grain diets has been related to an increase in *trans*-10 C_{18:1} and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid concentration in milk. These fatty acids are produced in the rumen of cattle fed high concentrate diets that results in low ruminal pH. However, it is not clear if the main cause of the production of these fatty acids is the level of concentrate in the diet, ruminal pH or both. Results obtained in the present experiment indicate that low pH is the main factor affecting the accumulation of biohydrogenation intermediates related with milk fat depression.

Key words: biohydrogenation, concentrate, PCR, pH