MODIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE *LOLIUM PERENNE* CUANDO SE SUPLEMENTA CON DIFERENTES DOSIS DE GRASA

G. Hervás[1,2], B.A. Williams[2], H. Boer[2] y S. Tamminga[2]

[1] Estación Agrícola Experimental (CSIC) Apdo. 788 – 24080 León (España)
[2] Animal Nutrition Group - Deparment of Animal Science. Wageningen University Marijkeweg 40, 6709 PG Wageningen (Holanda)

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se está realizando un importante esfuerzo en investigación encaminado a aumentar el contenido de ácidos grasos insaturados en la carne y la leche de los rumiantes, ya que se ha demostrado que algunos de estos compuestos poseen características anti-cancerígenas y anti-diabéticas y previenen la aparición de enfermedades cardiovasculares (Chilliard *et al.*, 2000; Kritchevsky, 2000). Entre estos ácidos grasos insaturados, cabe destacar el ácido linoleico conjugado, que se forma en el rumen por la hidrogenación microbiana de diversos ácidos grasos insaturados y cuyo contenido podría manipularse mediante la suplementación de la dieta con grasas no protegidas.

Sin embargo, su aplicación práctica se enfrentaría, en la actualidad, no sólo a la escasez de resultados acerca del efecto del aporte de grasa sobre la fermentación ruminal sino, además, a la variabilidad de la información existente. En este sentido, la literatura científica recoge tanto efectos negativos (Doreau y Chilliard, 1997) como positivos (Tamminga, 1989) de la suplementación con grasas y evidencia la necesidad de profundizar en este campo de investigación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la suplementación de un forraje, *Lolium perenne*, con diferentes dosis de grasa (extraída de plantas de la misma especie) sobre su fermentación ruminal *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una muestra fresca de *Lolium perenne* (MS = 199 g/kg) se utilizó para la extracción de la grasa necesaria para la suplementación. Para ello, y por duplicado, se mezclaron, en condiciones de anaerobiosis, 400 g de muestra con 3600 ml de etanol al 96% y 800 g de sulfato de sodio anhidro. La mezcla se centrifugó a 1000 × *g* y el sobrenadante se redujo hasta aproximadamente 500 ml en un evaporador de capa fina a 40°C.

El tratamiento de *L. perenne* (MS = 936 g/kg; PB = 140 g/kg MS; FND = 411 g/kg MS; FAD = 241 g/kg MS; EE = 42 g/kg MS), molido a 1 mm, se realizó por duplicado mediante la adición en anaerobiosis de 0 (Dosis 0), 150 (Dosis 1) y 300 (Dosis 2) ml de la solución de grasa extraída previamente sobre 14 g de muestra. Posteriormente, las muestras se secaron en una estufa de vacío a 40°C durante 3 horas.

Para estudiar la fermentación ruminal de las tres muestras de *L. perenne* se utilizó la técnica automática *in vitro* de producción de gas (Davies *et al*, 2000). Ocho réplicas de cada uno de los 3 alimentos (≈ 500 mg) se incubaron en el interior de botellas de 140 ml de volumen (Duran, Alemania). El líquido ruminal se recogió de 3 vacas fistuladas en el rumen que estaban en régimen de pastoreo durante el día. El inóculo se filtró a través de 4 capas de gasa y se añadió al medio de cultivo en una proporción de 1:9 (v/v). El medio de cultivo empleado fue el Medio B descrito por Lowe *et al.* (1985). Las botellas se cerraron y se introdujeron en un incubador, donde permanecieron a 39°C durante 96 horas. Al final de la prueba, en cada una de las

botellas se midió el pH, se tomaron 2 muestras para analizar la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y de ácidos grasos volátiles (AGV) y el residuo se filtró utilizando crisoles provistos de placa porosa y 10-15 ml de agua destilada caliente. A continuación, se quemaron a 550ºC para estimar la desaparición de MO (DMO).

Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo propuesto por Groot *et al.* (1996) para estimar la producción total de gas por gramo de MS incubada (A_{MS}, ml/g MS), el mayor ritmo de producción de gas (R_{max}, ml/h), el tiempo que tarda en alcanzar dicho ritmo (TR_{max}, h) y el momento en el que se alcanza la mitad de la asíntota ($t_{1/2}$, h).

El efecto de la dosis de grasa se estudió mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1989). Las comparaciones entre medias se realizaron utilizando el test de Tukey-HSD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La desaparición de MO y los parámetros cinéticos de producción de gas de las tres muestras de *Lolium perenne* se presentan en la tabla 1.

Tabla 1.- Desaparición de materia orgánica (DMO) y parámetros cinéticos de producción de gas (A_{MS}, R_{max}, TR_{max} y $t_{1/2}$) de *Lolium perenne* suplementado con diferentes dosis de grasa tras 96 horas de incubación.

Dosis	DMO (g/kg MS)	A_{MS} (ml/g MS)	R_{max} (ml/h)	TR_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)
0	858 ± 1,63	281^{b} ± 12,9	34,5^{b} ± 1,80	2,2^{b} ± 0,25	5,0^{b} ± 0,16
1	857 ± 1,59	276^{b} ± 4,2	30,6^{c} ± 1,13	3,2^{a} ± 0,27	5,7^{a} ± 0,26
2	862 ± 1,34	308^{a} ± 14,7	40,3^{a} ± 2,87	2,2^{b} ± 0,21	4,8^{b} ± 0,29

Al contrario de lo observado por Sutton *et al.* (1983), en este trabajo la DMO no sufrió ninguna reducción estadísticamente significativa (P>0,05) debido al tratamiento con grasa, lo que sugiere que este efecto podría depender de la cantidad y tipo de grasa utilizada. La Dosis 2 aumentó de forma significativa (P<0,05) la producción total de gas (A_{MS}) y su ritmo de producción (R_{max}). La Dosis 1, por el contrario, redujo significativamente (P<0,05) el ritmo de producción de gas (R_{max}), pero aumentó el tiempo que tarda en alcanzar dicho ritmo (TR_{max}) así como el tiempo transcurrido en alcanzar la mitad de la asíntota ($t_{1/2}$).

Tabla 2.- Valores medios de pH, nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico y total) de *Lolium perenne* suplementado con diferentes dosis de grasa tras 96 horas de incubación.

Dosis	pH	N-NH_3 (mg/l)	Acético (mmol/g MS)	Propiónico (mmol/g MS)	Butírico (mmol/g MS)	Total (mmol/g MS)
0	6,66^{b} ± 0,031	389 ± 8,9	5,37 ± 0,124	2,04^{b} ± 0,049	0,94^{b} ± 0,029	9,2^{b} ± 0,20
1	6,70^{a} ± 0,039	385 ± 6,6	5,58 ± 0,115	2,06^{b} ± 0,057	0,98^{b} ± 0,031	9,5^{a} ± 0,22
2	6,69^{ab} ± 0,030	379 ± 22,1	5,51 ± 0,267	2,13^{a} ± 0,056	1,05^{a} ± 0,055	9,8^{a} ± 0,14

Tal y como figura en la tabla 2, no existieron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) en la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3), lo que podría indicar que la adición de grasa no modificó la degradación y síntesis de

proteína. Sin embargo, la suplementación de *L. perenne* con grasa aumentó significativamente ($P<0,05$) el valor medio de pH, lo cual podría afectar a la lipolisis (Doreau y Ferlay, 1994; 1995).

La suplementación de *L. perenne* con grasa dio lugar a una mayor concentración de AGV (9,7 *vs.* 9,2 mmol/g MS), lo cual fue debido a un aumento en la producción de ácido propiónico y de ácido butírico, ya que la concentración de ácido acético no varió significativamente ($P>0,05$). Estos cambios coinciden con los observados por Doreau y Chilliard (1997), pero es importante no olvidar que podrían depender de diversos factores, tales como la dieta basal, la cantidad y naturaleza de la grasa o incluso la especie animal.

Los resultados obtenidos en el presente experimento, aunque evidentemente preliminares, sugieren que la suplementación de *L. perenne* con grasas no afectaría negativamente al metabolismo ruminal. Esto favorece que se continúe con los trabajos de investigación encaminados a aumentar la cantidad de ácidos grasos insaturados que se puedan absorber en el intestino para aumentar su contenido en la grasa de la leche y de la carne de los rumiantes.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo G. Hervás disfrutó de una ayuda para estancias breves en el extranjero del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura (MEC).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Mansbridge, R.M. and Doreau, M. 2000. *Ann. Zootech.*, 49, 181-205.

Davies, Z.S.; Manson, D.; Brooks, A.E.; Griffith, G.W.; Merry, R.J. and Theodorou, M.K. 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 83, 205-221.

Doreau, M. and Chilliard, Y. 1997. *Br. J. Nutr.*, 78, S15-S35.

Doreau, M. and Ferlay, A. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 45, 379-396.

Doreau, M. and Ferlay, A. 1995. *Livest. Prod. Sci.*, 43, 97-110.

Groot, J.C.J.; Cone, J.W.; Williams, B.A.; Debersaques, F.M.A. and Lantinga, E.A. 1996. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 64, 77-89.

Kritchevsky, D. 2000. *Br. J. Nutr.*, 83, 459-465.

Lowe, S.E.; Theodoruo, M.K.; Trinci, A.P.J. and Hesppel, R.B. 1985. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 2225-2229.

SAS. 1989.SAS/STAT®. User´s Guide Int. (v. 6, 4th Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Sutton, J.D.; Knight, R.; McAllan, A.B. and Smith, R.H. 1983. *Br. J. Nutr.*, 49, 419-432.

Tamminga, S. 1989. Forage digestion as influenced by feeding fats. In: *Advances in Dairy Technology*. J. Martin (Ed.), pp. 9-19. Proceedings of the 1989 Western Canacian Dairy Seminar. University of Alberta (Australia).