RECICLAJE DE PROTEÍNA EN CONEJOS: INCORPORACIÓN DE LISINA MICROBIANA EN ANIMALES EN CRECIMIENTO COMO MÉTODO DE MEDIDA

Belenguer[1], A., Balcells[1], J., Lopez[1], C., Abecia[1], L. y Decoux[2], M
[1]Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177. Zaragoza 50013.
[2]Cargill, Passeig Sant Joan 193. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Los herbívoros no poseen los enzimas necesarios para digerir los hidratos de carbono estructurales que componen la fibra, ésta únicamente puede ser utilizada parcialmente merced a ciertas poblaciones simbióticas de microorganismos que se alojan en el tracto digestivo. En los compartimentos de fermentación (rumen o ciego-colon) se produce un crecimiento de microorganismos que constituyen, a su vez, en el caso de los rumiantes, el mayor aporte digestivo de proteína. Sin embargo, cuando se trata de fermentadores ceco-colónicos esta proteína es desperdiciada con las heces. Los lagomorfos han desarrollado mecanismos de adaptación para aprovechar estos nutrientes: la cecotrofagia. Este mecanismo combina una retención selectiva de fluidos y pequeñas partículas en el ciego con cierta forma de coprofagia y les permite reciclar gran parte de la proteína microbiana sintetizada en el ciego. La cuantificación de este proceso es uno de los puntos más inciertos en los sistemas de alimentación del conejo.

La lisina, como aminoácido esencial, puede ser únicamente sintetizado por las bacterias cecales y por tanto el marcaje isotópico de este aminoácido puede constituir una herramienta de extraordinaria utilidad para determinar el origen de la lisina en los tejidos y en último termino conocer los niveles de ingestión de ambos componentes, lisina dietética *versus* lisina microbiana, como de hecho se ha realizado previamente en ratas (Torrallardona *et al.*,1996). En este trabajo se pretende establecer la cantidad de lisina ingerida por medio de la cecotrofia en conejos en crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 conejos de raza blanco Neozelandés, con un peso inicial de 1.127±0.0395 y una edad aproximada de 45 días, mantenidos individualmente durante el periodo de adaptación y posteriormente en jaulas metabólicas, siempre con un ciclo nictemeral 12:12 y libre acceso al agua de bebida. La dieta base se formuló en base a heno gramíneas (35 %), cebada (25 %), pulpa de remolacha (20 %), soja (15.5 %) y aceite de girasol, suplementada o no con $^{15}NH_4Cl$ (1 %). La alimentación se restringió a 100 g MF/d, distribuidos una vez al día alrededor de las 9 de la mañana. Se diseñaron tres tratamientos experimentales distintos, de 35 días de duración cada uno, dedicando en todos ellos los 5 primeros días a la adaptación a la dieta. El primer grupo (T1, 6 animales) recibió la dieta con isótopo durante todo el periodo experimental. Este grupo de animales fue sometido cada 5 días (12 h) a la fijación de collar para comprobar el enriquecimiento de la flora cecal en el transcurso del experimento. El segundo grupo (T2; 6 animales) fue alimentado con la ración base durante 25 días para ser cambiados durante los últimos 10 días a la ración con isótopo, al mismo tiempo que se les fijó el collar cervical para impedir la cecotrofia. El tercer grupo (T3; 4 animales) o grupo control recibió sólo la ración base. En todos los casos, los 5 últimos días del periodo experimental se realizó un balance de digestibilidad. Finalmente los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se tomaron muestras de contenido cecal, para la extracción de bacterias y se

muestrearon los tejidos, que fueron inmediatamente congelados. La concentración de aminoácidos de los diferentes sustratos fue determinada por HPLC, utilizando el método Pico-Tag (Cohen et al, 1989). La lisina fue aislada por cromatografía de intercambio iónico, y posteriormente su enriquecimiento en ^{15}N determinado por IRMS. La contribución de la lisina microbiana absorbida (Mlys) a la lisina total absorbida fue estimada mediante la siguiente ecuación:

$$Mlys = [E_T - E_{T0}] - [E_d - E_0] / [E_b - E_{b0}] - [E_d - E_0],$$

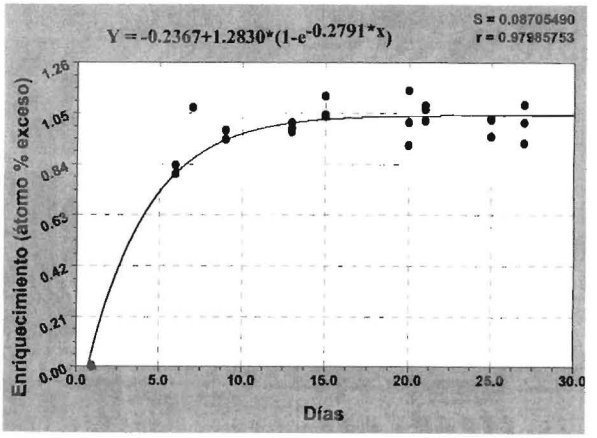
Siendo E_T el enriquecimiento de la lisina tisular en los animales del grupo 1, E_d y E_b los enriquecimientos de la dieta y bacterias respectivamente. E_0 se refiere al enriquecimiento basal de los animales del grupo control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enriquecimiento de la lisina en los diferentes sustratos

En la figura 1 se presenta la evolución del enriquecimiento en ^{15}N de las bacterias cecales aisladas por centrifugación diferencial. Ello implica que el amonio del $^{15}NH_4Cl$ fue absorbido, conjugado a urea y que esta una vez marcada constituyó la fuente de N mayoritaria para los microorganismos del rumen confirmando los resultados previos obtenidos por Forsythe y Parker (1985).

Figura 1. Evolución del enriquecimiento del nitrógeno total (átomo % exceso) en las bacterias cecales de los animales que recibieron la dieta suplementada con el isótopo durante 30 días



Con relación a la cinética observada, a los 10 días de administración del isótopo el enriquecimiento del N microbiano había alcanzado prácticamente una situación estable y ello implicaría que 30 días fueron mas que suficientes para que el isótopo estuviese equilibrado en los diferentes compartimentos y con ello que el enriquecimiento determinado en los diferentes tejidos respondería únicamente al aporte de los dos componentes de la lisina, la ración y la proteína microbiana

El enriquecimiento del N en la lisina de los animales del grupo 3 no difirió del enriquecimiento natural (AIEA, 0.366 %) y fue considerado el enriquecimiento basal para este particular sustrato, asumiendo la posibilidad de que en algunos procesos metabólicos el átomo y su isótopo puedan ser discriminados. Aquellos conejos que

habían ingerido el isótopo únicamente los diez últimos días del periodo experimental, pero en este caso evitando la cecotrofagia mediante la fijación del collar cervical, no mostraron ningún tipo de enriquecimiento en los tejidos mientras si lo mostraron en las bacterias cecales. Estos resultados demuestran fehacientemente la escasa o nula capacidad de absorción de proteína o sus derivados en el intestino grueso de los animales monogástricos herbívoros donde tienen lugar la mayor parte de los procesos fermentativos (Schmitz *et al.,* 1991). Aquellos animales que ingirieron la ración complementada con el isótopo mostraron un enriquecimiento en su flora cecal muy similar a la detectada en el grupo 2, de la que no difirió estadísticamente. Sin embargo, en este caso el enriquecimiento de los tejidos fue mayor al enriquecimiento natural y no difirió entre hígado y músculo como tejidos a estudio. El hecho de que el enriquecimiento del hígado y del músculo fueran idénticos implica que la lisina y el isótopo habían alcanzado el equilibrio en el "pool" de nitrógeno del animal. En este sentido es sabida la mayor capacidad del hígado, metabólicamente mas activo, de incorporar con mayor rapidez que el músculo las diferentes sustancias a estudio. No obstante, el resultado más importante es que el enriquecimiento determinado en los tejidos alcanzó niveles de enriquecimiento del 50 % de los valores determinados en las bacterias. Efectivamente la lisina microbiana fue incorporada en los tejidos y su importancia (+50%) estaría en el rango superior de aquellos autores que han determinado la producción de cecotrofos con otros procedimientos metodológicos, entre los que destacan la colocación del collar con la consiguiente recolección de cecotrofos. En cualquier caso nuestros resultados confirman la importancia del ciego del conejo como compartimento de fermentación susceptible, además, de ser manipulado para optimizar dicha potencialidad.

Tabla 1.- Enriquecimiento isotópico (E, % átomos en exceso) registrado en las bacterias cecales, en los tejidos así como la contribución microbiana a la lisina de los tejidos.

	E BACTERIAS	E TEJIDOS	CONTRIBUCIÓN LISINA MICROBIANA
Grupo 1	0.211±0.0097	0.109±0.0097	0.4974±0.04519
Grupo 2	0.221±0.0335	0.017±0.0026	
Grupo 3	0.000±0.0030	0.000±0.0022	

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por Cargill S.L. Paseig Sant Joan, 189. 08037 Barcelona. Proyecto PTR 95/0405-OP. Se agradece también la colaboración de R. Redondo del Laboratorio de isótopos estables en la Facultad de Ciencias de la UAM.

REFERENCIAS

Cohen, S.A., Meys, M. & Tarvin, T.L. (1989). Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA.

Forsythe, S.J. y Parker, D.S. (1985).. British Journal of Nutrition 54, 285-292.

Schmitz, M., Ahrens, F., Schön, J. & Hagemeister, H. (1991). In Digestive Physiology in Pigs. Proccedings of the Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, pp 85-87 [M.W.A. Verstegen, J. Huisman and L.A. den Hartog, editors]. Wageningen: Pudoc.

Torrallardona, D., Ian Harris, C., Coates, M.E. & Fuller, M.F. (1996). British Journal of Nutrition 76, 689-700.