ESTUDIO DEL EFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES SOBRE EL METABOLISMO NITROGENADO Y EL PERFIL DE FERMENTACIÓN EN UN SISTEMA DE CULTIVO CONTINUO

L. Castillejos[1], S. Calsamiglia[1], A. Ferret[1] y R. Losa[2]
[1]Dept. de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra.
[2]AKZONOBEL/CRINA SA, 15 Chemin de la Combe, 1196 Gland, Switzerland

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son componentes secundarios de plantas con propiedades antimicrobianas (Sivropoulou *et al.*, 1996). Esta actividad antimicrobiana ha sido estudiada por la industria alimentaria con el objetivo de utilizar aceites esenciales como aditivos alimentarios (Aureli *et al.*, 1992; Ismaiel y Pierson, 1996).

Actualmente se les atribuye una acción antimicrobiana sobre la flora ruminal implicada en el metabolismo proteico, provocando una disminución de la degradación de la proteína (McIntosh *et al.*, 2000). Algunos antibióticos ionóforos actúan sobre un grupo específico de bacterias HAP (hiper-productoras de amoníaco) inhibiendo la desaminación de los aminoácidos (Chen y Russell, 1990; Attwood *et al.*, 1998). Los aceites esenciales inhiben la desaminación provocando una disminución en la producción de amoníaco, tal vez por la inhibición de las bacterias HAP (Newbold *et al.*, 1999; McIntosh *et al.*, 2000). Por otro lado, Evans y Martin (2000) también sugieren que los aceites esenciales pueden modificar el perfil de fermentación del metabolismo ruminal.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de diferentes dosis de una mezcla de aceites esenciales sobre el metabolismo nitrogenado y el perfil de fermentación en un sistema de cultivo continuo de flujo doble.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando 8 fermentadores (1320 ml) de doble flujo continuo, desarrollados por Hoover *et al.* (1976), en dos periodos experimentales consecutivos de 9 días cada uno (6 días de adaptación y 3 días de muestreo). La dieta contenía (% MS) un 60.3% de heno de alfalfa, 17.2% de harina de maíz, 12.2% de harina de cebada, 9.7% de harina de soja, 0.34 % de sal, 0.21% de fosfato de sodio y 0.05% de una mezcla de vitaminas y minerales, y cumplía las recomendaciones del NRC (1989) para una vaca produciendo 30kg de leche/día con un 3.5% en grasa y 3.3% de proteína. Los fermentadores fueron dosificados con 95 g/d de MS suministrados en tres tomas diarias iguales a intervalos de 8 horas (0800; 1600; 2400). Los tratamientos fueron: Control (sin aceites esenciales); D1 (16mg/d); D10 (160mg/d) y D100 (1,6g/d). La mezcla de aceites esenciales, Crina® para rumiantes, es un producto comercial patentado por AKZO NOBEL S.A. Sus principales componentes son: timol, limonene, guayacol y resourcine.

Las condiciones de fermentación se mantuvieron constantes: Tª 39ºC; pH 6,4; y ritmo de paso de la fracción líquida y sólida a 10 y 5%/h, respectivamente.

El primer día de cada periodo, los fermentadores se inocularon con líquido ruminal de una vaca canulada alimentada con una ración 60:40 forraje:concentrado.

Durante los días de adaptación se recogieron muestras de líquido ruminal filtrado del fermentador dos horas después de la alimentación de la mañana (10:00), para determinar la concentración de N amoniacal y ácidos grasos volátiles (AGV). Durante los tres últimos días de muestreo se continuó recogiendo líquido ruminal filtrado de cada fermentador dos horas después de la alimentación de la mañana para determinar la concentración de AGV. Para analizar la evolución del metabolismo nitrogenado, se recogieron muestras de líquido ruminal filtrado a las 0, 2, 4 y 6 horas después de la alimentación de la mañana, para determinar el N soluble en ácido tricloroacético, el N soluble en ácido túngstico, y el N amoniacal. Estas fracciones de nitrógeno se utilizaron para calcular la concentración de N peptídico, N aminoacídico y N amoniacal.

Los resultados se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED del SAS (1996) para medidas repetidas (Littell *et al.*, 1998) y la comparación de medias se realizó mediante LSMEANS. El periodo se considero como efecto bloque. Los efectos principales del modelo fueron el tratamiento y el día, y su interacción, durante los días de adaptación para la concentración de N amoniacal y AGV. Para las fracciones nitrogenadas durante los días de muestreo, los efectos principales fueron el tratamiento y la hora, y su interacción. Se utilizó la estructura de covarianza que obtuvo el mayor criterio Schwarz's Bayesian en valor absoluto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración total de AGV aumentó un 7% en el tratamiento D1 vs Control (P=0.06). La proporción de acetato aumentó 5 unidades de porcentaje (P=0.06), la proporción de propionato y valerato disminuyó (P<0.05), y la proporción de isovalerato, la concentración de AGV ramificados y la relación acetato:propionato aumentó (P<0.05) en D1 respecto al Control (Tabla 1). El aumento en la concentración de AGV totales coincide con los resultados de experimentos anteriores (Castillejos *et al.*, 2003), y el perfil de AGV individuales se modificó en la misma dirección.

Tabla 1. Efecto de la dosis de aceites esenciales sobre el perfil de AGV.

	Tratamientos				
	Control	D1	D10	D100	EE
AGV Totales, mM	120,4 ^{y}	129,1 ^{x}	125,7	123,5	4,51
Ramificados, mM	3,10 ^{b}	4,90 ^{a}	5,95 ^{a}	4,71 ^{a}	0,78
AGV, mol/100mol					
Acetato	58,0 ^{y}	63,3 ^{x}	60,2	59,1	2,69
Propionato	20,6 ^{a}	16,9 ^{c}	17,5 ^{bc}	19,2 ^{ab}	1,07
Butirato	14,6	12,8	13,9	14,1	1,74
Valerato	4,22 ^{a}	3,25 ^{b}	3,71 ^{ab}	3,81 ^{ab}	0,45
Isobutirato	0,77	0,75	0,80	0,78	0,08
Isovalerato	1,77 ^{b}	3,04 $^{a\,y}$	3,92 $^{a\,x}$	3,01 $^{a\,y}$	0,51
Acetato:Propionato	2,86 $^{b\,y}$	3,75 $^{a\,x}$	3,51 $^{ab\,x}$	3,11 $^{ab\,y}$	0,32

$^{a, b, c}$ Medias con diferencias significativas (P<0,05)
$^{x, y}$ Medias con diferencias significativas (P<0,10)

En la Tabla 2 se muestran las medias de N peptídico, N aminoacídico y N amoniacal de las 0, 2, 4 y 6 horas postalimentación. La concentración media de N

peptídico del tratamiento D1 fue un 20% menor que la del Control (P<0.05). Esto sugiere que los aceites esenciales disminuyeron la degradación de la proteína, como indican estudios anteriores realizados con la misma mezcla de aceites esenciales (Molero *et al.*, 2003; McIntoch *et al.*, 2000), o que aumentaron la degradación de los péptidos, aunque Newbold *et al.* (1999) demostraron que estos aceites esenciales no estimulaban la peptidolisis. En consecuencia, parece razonable sugerir que los aceites esenciales redujeron la degradación de la proteína.

Los aceites esenciales no afectaron ni a la concentración de N aminoacídico ni a la concentración de N amoniacal. En un trabajo previo con las mismas condiciones experimentales la concentración de N amoniacal tampoco se modificó con la adición de aceites esenciales (Castillejos *et al.* 2003). Este resultado contrasta con los obtenidos por Newbold *et al.* (1999) que observaron una disminución del N amoniacal en el líquido ruminal de animales suplementados con aceites esenciales.

Tabla 2. Efecto de la dosis de los aceites esenciales sobre la concentración media de N peptídico, amoniacídico y amoniacal.

	Tratamientos				
	Control	D1	D10	D100	EE
Fracciones N, mg/100ml					
N Peptídico	5,98 [a]	4,88 [b]	5,58 [ab]	5,57 [ab]	0,50
N Aminoacídico	4,90	4,73	4,98	4,59	0,45
N Amoniacal	10,6	12,2	12,7	10,5	1,5

[a,b] Medias con diferencias significativas (P<0,05)

CONCLUSIONES

La administración de 16mg/d de la mezcla de aceites esenciales a cultivos continuos de líquido ruminal aumentó la concentración de AGV totales y modificó el perfil de fermentación de los ácidos grasos volátiles.

Los aceites esenciales parecen disminuir la degradación de la proteína sin afectar a la peptidolisis ni a la desaminación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FEDER 2FD97-2262

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attwood, G. T., A. V. Klieve, D. Ouwerkerk y B. K. C. Patel. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64:1796-1804.
- Aureli, P., A. Costantini y S. Zolea. 1992. J. Food Prot. 55:344-348
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret y R. Losa. 2003. ITEA (en prensa).
- Chen, G. y J. B. Russell. 1990. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2186-2192.
- Evans, J. D. y S. A. Martin. 2000. Curr. Microbiol. 41:336-340.
- Ismaiel, A. y M. D. Pierson. 1996. J. Food Sci. 55:1676-1678.
- Littell, R. C., P. R. Henry y C. B. Ammerman. 1996. SAS system for mixed models. SAS Institute inc., Cary, NC.
- McIntosh F. M., C. J. Newbold, R. Losa, P. Williams y R. J. Wallace. 2000. Reprod. Nutr. Dev. 40 (2), 221-222.
- Molero R., M. Ibars, R. Losa, S. Calsamiglia y A. Ferret. 2003. Anim. Feed Sci.Technol (en revisión).
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, P. Williams y J. D. Sutton. 1999. VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition, Abeerdeen.
- NRC. 1989. National Academy Press. Washington, D. C.
- Sivropoulou, A. , S. Kokkini, T. Lanaras y M. Arsenakis.1996. J. Agric. Food Chem. 44:1202-1205.