

FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE CEBADA EN FUNCIÓN DE NIVEL DE INCLUSIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN DIETAS PARA EL CEBEO DE TERNEROS

Amanzougarene, Z., Yuste, S., Vega A. y Fondevila, M.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza-CITA. Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. mfonde@unizar.es

INTRODUCCION

En dietas para rumiantes en cebo intensivo, así como para vacuno lechero, la adición de grasa en el concentrado permite aumentar la concentración energética y modificar el perfil de ácidos grasos absorbidos, además de atenuar la actividad fermentativa (Palmquist y Jenkins, 1980), contribuyendo a reducir el riesgo de acidosis ruminal. Sin embargo, un nivel de inclusión excesivamente alto puede afectar negativamente a la microbiota del rumen y a sus procesos fermentativos, efecto que puede variar con la naturaleza de la grasa (Doreau et al., 2009, Beauchemin et al., 2009). Los ácidos grasos de cadena media tienen un efecto antimicrobiano selectivo (Henderson, 1973), mientras que los de cadena larga deprimen la actividad microbiana en general, en especial los insaturados (Jenkins 1994). Este trabajo estudia, en condiciones *in vitro*, si la inclusión de diferentes dosis de ácidos grasos en dietas ricas en concentrado para el cebo de terneros puede reducir o ralentizar el ritmo de la fermentación microbiana, y con ello evitar un excesivo descenso del pH ruminal, contribuyendo a la prevención de la acidosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron tres tandas de incubación *in vitro* de 24 horas, a 39 °C y en atmósfera de CO₂, en un sistema con cultivos ruminales no renovados, reduciendo la concentración de bicarbonato en la solución de incubación para mantener el pH alrededor de 6,2 (Amanzougarene et al., 2015). Se empleó cebada como modelo de sustrato concentrado (500 mg por botella), sola o suplementada con tres niveles (2, 4 y 6 mg/g) de una mezcla de AGM (de 6 a 12 átomos de carbono, Ka Plus, NUTRIKA Managing Animal Nutrition) y dos sustratos comerciales, diferentes en cuanto a tamaño y grado de saturación; ácido palmítico (PAL) y ácido linoleico (LIN), ambos incluidos a 15, 30 y 45 mg/g. Las dosis de inclusión de ácidos grasos de cadena media fueron menores que las de ácido linoleico y ácido palmítico debido a que, mientras los efectos del primer aditivo son selectivos sobre determinadas especies de bacterias ruminales, pudiendo modificar así la actividad microbiana, en los últimos la respuesta depende de la reducción de la actividad fermentativa general en función de su concentración (Jenkins 1994). Se incubaron tres botellas por tratamiento y tanda, con 80 ml de medio de incubación. Como inóculo se empleó líquido de rumen procedente de tres terneros de cebo canulados, utilizando inóculo de un ternero diferente en cada tanda. La producción de gas se determinó por cambios de presión a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 h de incubación, que se presenta por unidad de materia orgánica (MO). A las 8 h se determinó el pH del medio con una botella por tratamiento. Al finalizar la incubación, se determinó el pH a las 24 h y se estimó la desaparición de materia seca (dMS). La masa microbiana de la fase líquida se determinó por centrifugación a 10000 x g durante 20 minutos (Hsu y Fahey, 1990). Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA, considerando la tanda de incubación como bloque y la media de las botellas como unidad experimental. Los niveles de inclusión de cada aditivo se compararon respecto al control (sin aditivo) mediante el test de Dunnett y se establecieron contrastes ortogonales para comparar los aditivos entre sí y contrastes polinomiales (lineal y cuadrático) para estimar la tendencia en la respuesta de cada aditivo. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

La inclusión de los distintos niveles tanto de AGM como de ácido palmítico no afectó al volumen de gas producido por la fermentación de la cebada (Tabla 1). De hecho, en ningún caso se detectaron diferencias entre ninguno de los niveles de inclusión de estos compuestos y la cebada no suplementada (Control). Por el contrario, la inclusión del nivel alto de ácido linoleico promovió una menor producción de gas ($P < 0,05$) respecto al volumen de gas producido con la cebada no suplementada a partir de las 12 h de incubación, que se reflejó en una evolución descendiente de tipo cuadrático ($P < 0,05$) durante todo el periodo de incubación, promovido por el menor volumen de gas registrado con el nivel de inclusión alto

respecto al Control. No se detectaron diferencias entre los diferentes aditivos en cuanto a la producción de gas, aunque con AGM tendió a ser mayor que con ácido linoleico a las 18 y 24 h de incubación (P=0,09 y P=0,07, respectivamente).

Tabla 1. Volumen de gas producido (ml/g MO) a distintos tiempos de incubación *in vitro*, con cebada sola (0) o con tres niveles (bajo, medio y alto) de una mezcla de ácidos grasos de cadena media (AGM), ácido palmítico y ácido linoleico

	Nivel	tiempo de incubación, h					
		2	6	10	12	18	24
Control	0	29,8	79,6	117,5	132,5	153,6	175,6
AGM	Bajo	26,5	69,5	101,3	116,2	136,6	157,0
	Medio	23,7	67,1	98,0	111,2	130,3	149,9
	Alto	21,7	63,0	94,1	107,2	125,5	141,9
valor medio	---	24,0	66,5	97,8	111,5	130,8	141,6
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ácido palmítico	Bajo	18,2	59,7	91,2	105,4	123,1	142,7
	Medio	17,6	57,6	90,1	104,2	120,5	140,4
	Alto	16,8	55,8	86,7	99,8	118,6	140,0
valor medio	---	17,5	57,7	89,3	103,1	120,7	141,0
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ácido linoleico	Bajo	24,2	67,7	97,0	109,9	125,7	144,5
	Medio	13,9	54,4	83,7	96,6	114,0	132,4
	Alto	13,6	51,3	79,0	90,0*	105,2*	122,7*
valor medio	---	17,2	57,8	86,6	98,8	115,0	133,2
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,007
desviación residual estándar		9,75	14,93	16,55	17,00	18,73	18,38

NS: P>0,05; *: valores con asterisco indican diferencias con el control (P<0,05)

No se observó una respuesta a la adición de los distintos ácidos grasos sobre el pH de incubación a las 8 y 24 h, excepto una tendencia cuadrática (P=0,06) al aumento del pH a las 24 h con AGM. Esta ausencia de respuesta a las 8 h puede deberse en parte por la inclusión, aunque a baja concentración, de tampón en el medio de incubación para mantenerlo a niveles próximos a 6,2. No obstante, a partir de ese tiempo la capacidad tampón se consume en estas condiciones de incubación (Amanzougarene et al., 2015), por lo que la respuesta a las 24 h puede considerarse independiente del tampón del medio. La inclusión de AGM a niveles intermedio y alto redujo la dMS de la cebada (P<0,05), mostrando un descenso cuadrático (P=0,001) respecto al control. Igualmente, la inclusión de ácido linoleico redujo de forma cuadrática la dMS respecto al control (P=0,006), mientras que ácido palmítico no afectó a este parámetro ni a la producción de gas. La inclusión tanto de AGM como de ácido linoleico redujo cuadráticamente (P<0,05) respecto al control la masa microbiana asociada a la fase líquida, aunque hay que tener en cuenta que el método de estimación de este parámetro es inespecífico, y determina únicamente la masa microbiana de la fase líquida, por lo que sus resultados deben tomarse con precaución.

La inclusión de los tres aditivos no afectó de forma manifiesta la fermentación microbiana *in vitro* de la cebada en términos de los parámetros estudiados, aunque promovieron una mayor llegada de material potencialmente digestible a tramos posteriores. Sin embargo, las diferencias en la respuesta entre el volumen de gas producido y la dMS sugieren que el patrón de fermentación, en términos de proporciones molares de ácidos grasos volátiles, pudo ser diferente, aunque no se dispone de resultados al respecto. Es de destacar la tendencia (P=0,06) a un aumento del pH del medio tras 24 h de incubación con la adición de

AGM, sin modificar la magnitud o el ritmo de fermentación, lo que pudiera sugerir unas mejores condiciones ambientales en el rumen de terneros de cebo con la utilización de este aditivo. No obstante, la constatación de este efecto requeriría un estudio con un medio con capacidad tampón todavía más débil.

Tabla 2. Valores de pH a las 8 y 24 h de incubación, desaparición de materia seca (dMS) y masa microbiana a las 24 h, con cebada sola (0) o con tres niveles (bajo, medio y alto) de una mezcla de ácidos grasos de cadena media (AGM), ácido palmítico y ácido linoleico.

	Nivel	pH 8 h	pH 24 h	dMS	Masa microbiana (mg/ml)
Control	0	6,17	5,86	0,434	2,64
AGM	Bajo	6,13	5,92	0,387	2,45
	Medio	6,10	5,94	0,372*	2,40
	Alto	6,13	5,97	0,339*	2,26*
valor medio	---	6,12	5,94	0,366	2,37
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		NS	NS	0,001	0,008
Ácido palmítico	Bajo	6,11	5,88	0,403	2,64
	Medio	6,14	5,89	0,395	2,53
	Alto	6,11	5,87	0,396	2,49
valor medio	---	6,12	5,88	0,398	2,55
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		NS	NS	NS	NS
Ácido linoleico	Bajo	6,08	5,90	0,420	2,62
	Medio	6,10	5,91	0,385	2,50
	Alto	6,05	5,88	0,378	2,40
valor medio	---	6,08	5,90	0,394	2,51
<i>P lineal</i>		NS	NS	NS	NS
<i>P cuadrática</i>		NS	NS	0,006	0,021
desviación residual estándar		0,048	0,058	0,025	0,124

NS: $P > 0,05$; *: valores con asterisco indican diferencias con el control al $P < 0,05$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amanzougarene, Z, Schauf, S, Fondevila, M. 2015. XVI Jornadas de AIDA, vol I: 212-214.
- Beauchemin, KA, McGinn, SM, Benchaar, C, Holtshausen, L. 2009. J. Dairy Sci. 92 :2118–2127
- Doreau, M, Arousseau, E, Martin, C. 2009. Anim. Feed Sci. Technol. 150: 187-196
- Henderson, C. 1973. J. Agric. Sci., 81: 107-112
- Hsu JT & Fahey GCJr. 1990. J. Dairy Sci. 73: 149-152
- Jenkins, T.C. 1994. J. Nutr. 124, 1372-1376
- Palmquist, D.L. & Jenkins, T.C. 1994. J. Dairy Sci. 63: 1-14,

Agradecimientos: Trabajo financiado con el Proyecto AGL 2013-46820 (MINECO), con la ayuda del Departamento de Industria e Innovación (Gobierno de Aragón) y el Fondo Social Europeo. S. Yuste disfrutó una beca FPU (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte).

***In vitro* fermentation of barley according to the inclusion of levels of fatty acid additives in diets for intensive beef production**

Abstract. A mixture of medium-chain fatty acids (AGM), palmitic acid and linoleic acid were added at three levels to evaluate their effect on *in vitro* barley fermentation in intensive feeding beef diets, using low-buffered medium. The mixture of medium-chain fatty acids did not affect gas production from barley but decreased quadratically ($P=0.001$) dry matter disappearance (DMd). In contrast, the higher level of linoleic acid decreased gas production from 12 to 24 h ($P<0.05$), but did not affect DMd ($P>0.05$), and palmitic acid did not affect gas production nor DMd ($P>0.05$). Consequently, the three studied fatty acids did not negatively affect the medium pH throughout the incubation.

Keywords: fatty acid additives, pH, *in vitro* barley fermentation, intensive beef feeding