

# COMUNICACIÓN BREVE: ESTUDIO DEL ORIGEN DEL ÁCIDO RUMÉNICO PRESENTE EN LA GRASA LÁCTEA DE CABRAS MEDIANTE UN MODELO DE REGRESIÓN LINEAL

Short communication: A linear regression model to study the origin of rumenic acid in goat milk fat.

Alfonso Cívico<sup>1</sup>, Nieves Núñez<sup>1</sup>, Pilar Gómez-Cortés, Francisco Peña<sup>1</sup>, Miguel Angel de la Fuente<sup>2</sup>, Manuela Juárez<sup>2</sup>, Andrés Luis Martínez\*

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14071 Córdoba, España. <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España. \*Autor para correspondencia: pa1martm@uco.es

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue investigar en qué medida la delta-9 ( $\Delta^9$ ) desaturación del ácido vaccénico (AV) en la glándula mamaria de cabras contribuye al contenido de ácido ruménico (AR) en la grasa láctea (GL) de aquellas, mediante un modelo de regresión lineal. Para ello, se utilizó la composición de ácidos grasos (AG) de 56 muestras individuales de GL procedentes de una serie de trabajos en los que se estudió el efecto de la adición de aceite de lino (LIN) a una ración basal (CON) sobre el perfil de AG de la leche. La GL del tratamiento CON mostró menores contenidos de AV y AR (0,99 vs 3,68 g/100 g AG y 0,61 vs 1,65 g/100 g AG, respectivamente;  $P < 0,001$ ). La  $\Delta^9$  desaturación del AV y el porcentaje de AR derivado de aquella en la GL, estimados con el modelo, fueron mayores en el tratamiento CON (31,01 vs 22,50% y 77,22 vs 61,25%, respectivamente,  $P < 0,05$ ). El índice de  $\Delta^9$  desaturación [AR / (AR + AV)] también tuvo un valor mayor en CON (0,37 vs 0,31;  $P < 0,001$ ). Estos resultados sugieren que los cambios en la actividad de la enzima esteroil-CoA desaturasa sobre el AV en la glándula mamaria de cabras, en respuesta al aumento de la disponibilidad de AR de origen intestinal por cambios dietarios, son reflejados tanto por el modelo de regresión lineal como por el índice de  $\Delta^9$ , desaturación. El modelo de regresión lineal tiene la ventaja de que permite determinar la proporción de AR de la GL que deriva de la conversión del AV en la glándula mamaria y aquella que procede de la absorción intestinal y se incorpora directamente a la GL.

**Palabras clave:** Grasa láctea; aceite de lino; ácido ruménico.

## ABSTRACT

The aim of this work was to use a linear regression model in order to quantify the contribution of vaccenic acid (VA) to the rumenic acid (RA) content in goat milk fat, through delta-9 ( $\Delta^9$ ) desaturation in the mammary gland. A total of 56 individual milk fat samples obtained from a series of experiments carried out to study the effects of linseed oil addition (LIN treatment) to a basal diet (CON treatment) on milk fatty acid (FA) profile were used. Milk fat (MF) in the CON treatment had lower contents of VA and RA (0.99 vs. 3.68 g/100 g FA and 0.61 vs. 1.65 g/100 g FA, respectively,  $P < 0.001$ ). The VA  $\Delta^9$  desaturation and the percentage of RA that derived from it in MF were higher in the CON treatment (31.01 vs. 22.50% and 77.22 vs 61.25%, respectively,  $P < 0.001$ ). The  $\Delta^9$  desaturation index also had a higher value in the CON treatment (0.37 vs. 0.31,  $P < 0.001$ ). These results suggest that both the  $\Delta^9$  desaturation index and the linear regression model would reflect the changes in the goat mammary steroil-CoA desaturase activity on VA in response to an increased availability of RA from intestinal origin due to changes in the composition of diets. The regression model was useful to calculate which proportion of RA in MF comes from the conversion of VA in the mammary gland and which one is from intestinal origin and is directly incorporated into MF.

**Key words:** Milk fat; linseed oil; rumenic acid.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos (AG) insaturados de 18 átomos de carbono que se encuentran presentes en los alimentos consumidos por los rumiantes son convertidos en ácido esteárico (C18:0) por las bacterias del rumen en el proceso de biohidrogenación ruminal (BHR). El ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11; AV) es un producto intermedio común, previo a la producción de ácido esteárico, en las rutas de BHR de los ácidos linoleico (C18:2 *cis*-9,*cis*-12) y  $\alpha$ -linolénico (C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15). El ácido ruménico (C18:2 *cis*-9,*trans*-11; AR) es un producto intermedio previo a la producción de AV que aparece exclusivamente en la ruta de BHR del ácido linoleico [4]. En la grasa láctea (GL), el AV es de exclusivo origen ruminal, mientras que una parte del AR procede del rumen y otra se sintetiza en la glándula mamaria por delta-9 ( $\Delta^9$ ) desaturación del AV, mediante la acción de la enzima estearoil-CoA desaturasa (ECD) [14]. La relación entre los contenidos de ambos AG en la leche es estrictamente lineal, lo que indica que la  $\Delta^9$  desaturación del AV es una fuente importante del AR presente en la misma [4]. Se ha comprobado que la inhibición de la actividad de dicha enzima mediante la inyección intravenosa de ácido estercúlico disminuye drásticamente la presencia de AR en la leche de los rumiantes [3, 5].

Kelsey y col. [6] calcularon el índice de desaturación del AV en la ubre mediante la relación  $[AR / (AR + AV)]$ . Este índice se relaciona positivamente con la actividad de la ECD en la glándula mamaria de cabras (*Capra hircus* L.) y otras hembras rumiantes, pero su utilidad como indicador de dicha actividad es limitada debido al doble origen del AR [2]. Palmquist y col. [12] propusieron un modelo de regresión lineal para cuantificar la  $\Delta^9$  desaturación del AV y calcular la fracción de AR de origen endógeno. El objetivo del presente trabajo fue aplicar dicho modelo para cuantificar la conversión del AV a AR en la glándula mamaria y estimar su contribución al contenido total de AR en la GL de cabras alimentadas con una ración basal enriquecida con aceite de lino (*Linum usitatissimum* L.) (LIN).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los datos de composición de la GL de 56 muestras individuales de leche que se obtuvieron en una serie de trabajos en los que se investigó el efecto de la inclusión de LIN en la ración de cabras sobre los contenidos de los AG de la leche. Los animales utilizados y sus condiciones de alojamiento, sanidad y manejo, así como el análisis de la GL lo señalan varios trabajos [7, 9]. Las experiencias se llevaron a cabo en el Centro Usuario de Animales de Experimentación CO/5/U ubicado en el edificio del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba. El procedimiento experimental cumplió con la normativa española de protección de animales de experimentación vigente (Real Decreto 1201/2005, de 10

de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos). Se utilizaron cabras multíparas de raza Malagueña al comienzo del segundo tercio de la lactación, alojadas individualmente en jaulas metálicas de 1 x 1,4 m con suelo permeable a los excrementos, alimentadas de forma individual y mantenidas en un ambiente controlado. Los promedios de peso vivo y producción de leche corregida al 4% de grasa fueron  $46,6 \pm 0,5$  kilos (kg) y  $1912 \pm 210$  gramos (g) / día (d). En todos los experimentos, se suministró una ración basal común compuesta por heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y un concentrado granulado (CON), a la que se adicionó LIN (TABLA I). La GL se extrajo por doble centrifugación. La primera centrifugación se realizó a una velocidad de 17800 g durante 30 min (Beckman Avanti 30, Beckman, Fullerton, EUA). La segunda centrifugación se realizó a una velocidad de 19300 g durante 20 min (Eppendorf 5415D, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los ésteres metílicos se obtuvieron por metilación básica y la composición de la GL se determinó mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Agilent 6890 N Network System, Agilent, Palo Alto, EUA). La inyección de las muestras de ésteres metílicos en hexano (1/100) se llevó a cabo en una columna capilar de sílice fundida CP-Sil 88 de 100 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 mm de grosor de película (Varian, Middelburg, Holanda). El gas portador (helio) operó a una presión constante de 236 kPa y la temperatura del inyector y del detector fue 250 °C. La temperatura inicial del horno fue 160 °C durante 80 min, después se elevó 10 °C/min hasta 210 °C y se mantuvo constante durante 35 min. La cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos individuales se realizó con referencia a una GL de composición certificada (CRM 164; European Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

El procedimiento MIXED del programa SAS University Edition 3.4 (SAS Institute, Cary, NC) se utilizó en los análisis de los datos, siguiendo modelos metaanalíticos [13]. El número de experimento y su interacción con la variable de clase o la covariable, según el caso, se incluyeron como efectos aleatorios en los modelos estadísticos. Los datos utilizados fueron ponderados por la raíz cuadrada del número de animales en cada uno de los tratamientos originales utilizando la declaración WEIGHT [13]. Las intersecciones y los coeficientes de regresión (pendientes) de las ecuaciones para los dos grupos de muestras se obtuvieron por análisis de la covarianza, usando el contenido de AR como variable y el de AV como covariable, de acuerdo con el modelo propuesto [12]. Los contenidos de AV y AR medidos en la GL, así como los parámetros predichos por las ecuaciones de regresión se compararon por análisis de la varianza usando el tratamiento (CON y LIN) como efecto fijo.

TABLA I

**COMPOSICIÓN DE LAS RACIONES DE LOS EXPERIMENTOS CUYOS RESULTADOS SE UTILIZARON PARA CONSTRUIR LAS ECUACIONES DE REGRESIÓN LINEAL (CON = DIETA BASAL; LIN = DIETA BASAL MÁS ACEITE DE LINO)**

	Martínez Marín y col. [7]		Martínez Marín y col. [8]			Martínez Marín y col. [9]		
	CON	LIN	CON	LIN	LIN	LIN	CON	LIN
Número de cabras	16	16	9	3	3	3	3	3
Ración, g/d								
Heno de alfalfa	500	500	600	600	600	600	600	600
Concentrado <sup>(1)</sup>	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
Aceite de lino <sup>(2)</sup>	-	48	-	30	48	66	-	48
Ácidos grasos aportados, g/d								
Palmítico	4,8	7,4	5,1	6,7	7,7	8,6	5,1	7,7
Estearico	0,7	2,5	0,8	2,0	2,6	3,3	0,8	2,6
Oleico	5,5	15,5	6,9	13,2	16,9	20,7	6,9	16,9
Linoleico	14,2	22,2	14,4	19,4	22,4	25,4	14,4	22,4
α-Linolénico	3,0	26,9	3,4	18,4	27,3	36,3	3,4	27,3

<sup>(1)</sup>Composición (g/kg): maíz, 375; cebada, 374,9; harina de soja, 200; premezcla de vitaminas y minerales (Maxi Nutral Ovejas, Nutral, Madrid, España), 30; aglomerante (Exal, Tolsa, Madrid, España), 20; antioxidante (Luctanox, Lucta, Barcelona, España), 0,1.

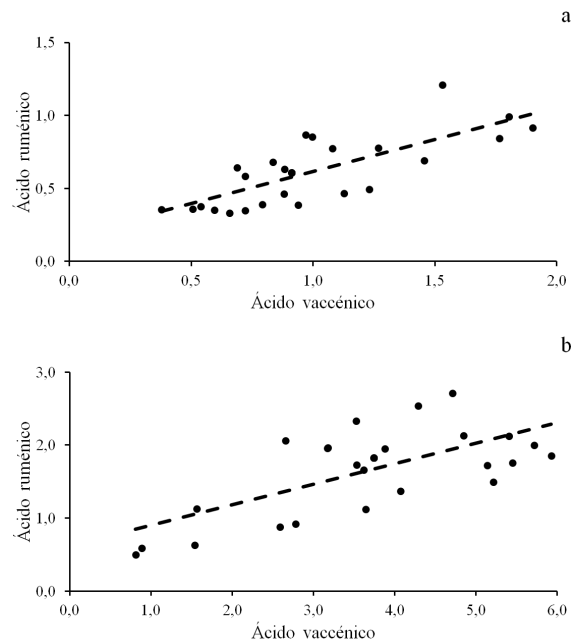
<sup>(2)</sup>Incluido en el concentrado a mayores, de forma que las proporciones finales fueron 97,6, 96,1 y 94,8% del conjunto de ingredientes distintos del aceite y 2,4, 3,9 y 5,2% de aceite en los concentrados de las raciones con 30, 48 y 66 g/d de aceite, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de alojamiento y manejo y que las raciones basales fueron prácticamente idénticas (TABLA I), los diferentes ( $P < 0,001$ ) contenidos de AV y AR en la GL se debieron en su mayor parte al efecto de la adición de LIN a la ración basal (TABLA II). Es un hecho conocido que la inclusión de LIN en raciones similares para cabras ocasiona un aumento de los contenidos de AV y AR en la GL, tanto por la mayor disponibilidad mamaria de AR absorbido en el intestino delgado, derivado de la BHR del ácido linoleico presente en el aceite, como por la  $\Delta^9$  desaturación mamaria del AV producido en la BHR de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico [10].

En el tratamiento CON (FIG. 1<sup>a</sup>), la ecuación de regresión obtenida fue: AR (g/100 g AG) = 0,124 ( $\pm 0,095$ ) + 0,451 ( $\pm$

0,063) x AV (g / 100 g AG) ( $P < 0,001$ ;  $R^2 = 0,63$ ; RECM = 0,12). En el tratamiento LIN (FIG. 1b), la ecuación obtenida fue: AR (g/100 g AG) = 0,592 ( $\pm 0,371$ ) + 0,289 ( $\pm 0,095$ ) x AV (g / 100 g AG) ( $P < 0,001$ ;  $R^2 = 0,48$ ; RECM = 0,42). La fracción de AR procedente del rumen que fue captada por la ubre en cada uno de los tratamientos correspondería a las intersecciones de las ecuaciones, en tanto que el porcentaje de desaturación del AV se puede calcular a partir del coeficiente de regresión [12]. La proporción calculada de AR de origen endógeno y el porcentaje de  $\Delta^9$  desaturación del AV calculados con las ecuaciones obtenidas en el presente trabajo (TABLA II) coinciden con los resultados obtenidos en estudios realizados con isótopos radioactivos en cabras, en los que se ha observado que un 63-73% del AR de la GL procede del AV, cuya desaturación estaría en torno al 32% [1]. Valores similares a los reportados en vacas (*Bos taurus* L.) [11] y ovejas (*Ovis aries* L.) [3].



**FIGURA 1. RELACIÓN ENTRE LOS CONTENIDOS (G/100 G DE ÁCIDOS GRASOS) DE LOS ÁCIDOS VACCÉNICO Y RUMÉNICO EN LA GRASA LÁCTEA DE CABRAS QUE CONSUMIERON UNA RACIÓN BASAL (a) O LA MISMA RACIÓN CON ADICIÓN DE ACEITE DE LINO (b).**

**TABLA II**  
**CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS VACCÉNICO Y RUMÉNICO EN LA GRASA LÁCTEA, Y VALORES CALCULADOS A PARTIR DEL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL (CON = DIETA BASAL; LIN = DIETA BASAL MÁS ACEITE DE LINO)**

Parámetros	CON	LIN	EEM	P
Ácido vaccénico medido, g / 100 g de ácidos grasos	0,99	3,68	0,225	<0,001
Desaturación <sup>(1)</sup> , %	31,01	22,50	0,811	0,028
Total disponible en la ubre <sup>(2)</sup> , g / 100 g de ácidos grasos	1,49	4,74	0,281	<0,001
Ácido ruménico medido, g / 100 g de ácidos grasos	0,61	1,65	0,091	<0,001
Origen ruminal calculado <sup>(3)</sup>				
g/100 g de ácidos grasos	0,13	0,59	0,035	0,008
% del ácido ruménico total	22,77	38,45	1,858	0,021
Origen mamario calculado <sup>(4)</sup>				
g/100 g de ácidos grasos	0,49	1,06	0,059	<0,001
% del ácido ruménico total	77,22	61,55	1,858	0,020
Índice de desaturación <sup>(5)</sup>	0,37	0,31	0,009	<0,001

EEM: Error estándar de la media

<sup>(1)</sup>100 x (β1/1+ β1); donde β1 es el coeficiente de la ecuación de regresión [12].

<sup>(2)</sup>Suma del ácido vaccénico medido experimentalmente y el que fue desaturado según el modelo.

<sup>(3)</sup>Diferencia entre el ácido ruménico predicho por el modelo y el ácido vaccénico que fue desaturado según el mismo, equivale a la intersección de la ecuación de regresión.

<sup>(4)</sup>Procedente del ácido vaccénico que fue desaturado según el modelo.

<sup>(5)</sup>Ácido ruménico/(ácido ruménico + ácido vaccénico), a partir de los valores medidos [6].

El AR procedente del rumen fue mayor, en valores absoluto ( $P = 0,008$ ) y relativo ( $P = 0,021$ ), en el tratamiento LIN. Este resultado era de esperar ya que dicho tratamiento aportó a los animales un 56% más de ácido linoleico que el tratamiento CON (TABLA I) y, por tanto, hubo más sustrato para la producción ruminal de AR [4]. A pesar de que la cantidad total de AV disponible para la glándula mamaria fue mayor ( $P < 0,001$ ) en el tratamiento LIN, el porcentaje de  $\Delta^9$  desaturación fue menor ( $P = 0,028$ ) en dicho tratamiento. En la misma línea, el índice de  $\Delta^9$  desaturación tuvo un valor inferior ( $P < 0,001$ ) en el tratamiento LIN. Esto indicaría que la glándula mamaria no respondió al aumento de la disponibilidad de AV, derivado de la mayor cantidad de sustrato para la BHR en el tratamiento LIN (TABLA I), con un aumento proporcional de la  $\Delta^9$  desaturación. A su vez, ello supuso que la GL de dicho tratamiento tuviera una proporción menor ( $P = 0,020$ ) de AR de origen mamario. Se ha especulado que la reducción de la  $\Delta^9$  desaturación que se observa cuando las raciones incluyen fuentes vegetales de grasa ricas en AG insaturados podría deberse al efecto negativo de determinados productos intermedios de rutas alternativas de la BHR, cuya producción aumenta en esas circunstancias, y/o a la mayor disponibilidad de AG insaturados de cadena larga sobre la actividad de la ECD en la glándula mamaria [2]. En este sentido, los resultados del presente trabajo sugieren que la disminución de la actividad de la ECD sobre el AV podría deberse, entre otras causas, a un aumento de la disponibilidad de AR preformado procedente del rumen.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que podría cuantificarse el porcentaje de desaturación del AV en la glándula mamaria, así como estimar los porcentajes de AR de origen ruminal y mamario en la GL de cabras en respuesta a cambios en la composición de la ración, mediante un modelo de regresión lineal. Hubo concordancia entre el índice de  $\Delta^9$  desaturación y el modelo de regresión lineal, y este último ofrece la ventaja de que informa sobre cuál es la proporción de AR de la GL que deriva de la conversión del AV en la glándula mamaria y cuál es la proporción que procede de la absorción intestinal y se incorpora directamente a la GL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BERNARD, L.; MOURIOT, J.; ROUEL, J.; GLASSER, F.; CAPITAN, P.; PUJOS-GUILLOT, E.; CHARDIGNY, J.M.; CHILLIARD, Y.; Effects of fish oil and starch added to a diet containing sunflower-seed oil on dairy goat performance, milk fatty acid composition and *in vivo*  $\Delta^9$ -desaturation of [13 C] vaccenic acid. **Br. J. Nutr.** 104:346-354. 2010.
- [2] BERNARD, L.; LEROUX C.; CHILLIARD, Y. Expression and nutritional regulation of stearoyl-CoA desaturase genes in the ruminant mammary gland: Relationship with milk fatty acid composition. In: Ntambi, J. M. (Ed.) **Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism**. Springer, New York. Pp 161-193. 2013.
- [3] BICHI, E.; TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUAREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Inhibition of delta(9)-desaturase activity with sterculic acid: Effect on the endogenous synthesis of cis-9 18:1 and cis-9, trans-11 18:2 in dairy sheep. **J. Dairy Sci.** 95:5242-5252. 2012.
- [4] GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz, M. P.; Mossoba, M. M.; Kramer, J. K. G.; Pariza, M. W.; Nelson, G. J. (Eds.) **Advances in Conjugated Linoleic Acid** Rewsearch Vol. 1. AOCS Press, Champaign. Pp 180-200. 1999.
- [5] GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. **J. Nutr.** 130:2285-2291. 2000.
- [6] KELSEY, J. A.; CORL, B. A.; COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. **J. Dairy Sci.** 86:2588-2597. 2003.
- [7] MARTÍNEZ-MARÍN, A. L.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; GÓMEZ-CASTRO, G.; JUÁREZ, M.; PÉREZ-ALBA, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Animal performance and milk fatty acid profile of dairy goats fed diets with different unsaturated plant oils. **J. Dairy Sci.** 94:5359-5368. 2011.
- [8] MARTÍNEZ-MARÍN, A. L.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; GÓMEZ-CASTRO, G.; JUÁREZ, M.; PÉREZ-ALBA, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Effects of feeding increasing dietary levels of high oleic or regular sunflower or linseed oil on fatty acid profile of goat milk. **J. Dairy Sci.** 95:1942-1955. 2012.
- [9] MARTÍNEZ-MARÍN, A. L.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; GÓMEZ-CASTRO, G.; JUÁREZ, M.; PÉREZ-ALBA, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Adición de aceites vegetales a la dieta de cabras lecheras: efecto sobre el contenido de ácidos grasos de la grasa láctea. **Arch. Med. Vet.** 45:259-266. 2013.
- [10] MARTÍNEZ-MARÍN, A. L.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N.; JUÁREZ, M.; GARZÓN-SIGLER, A. I.; PEÑA-BLANCO, P.; DE LA FUENTE, M. A. Associations between major fatty acids in plant oils fed to dairy goats and C18 isomers in milk fat. **J. Dairy Res.** 82:152-160. 2015.
- [11] MOSLEY, E. E.; SHAFII, B.; MOATE, P. J.; MCGUIRE, M. A. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **J. Nutr.** 136:570-575. 2006.
- [12] PALMQUIST, D. L.; ST-PIERRE, N.; MCCLURE, K. E. Tissue fatty acid profiles can be used to quantify endogenous rumenic acid synthesis in lambs. **J. Nutr.** 134:2407-2414. 2004.
- [13] SAUVANT, D.; SCHMIDELY, P.; DAUDIN, J. J.; ST-PIERRE, N. R. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. **Anim.** 2:1203-1214. 2008.
- [14] SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: Sels. B.; Philippaerts, A. (Eds.) **Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils**. The Royal Society of Chemistry, London. Pp 1-65. 2014.