



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado
RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE LA LECHE PROCEDENTES DEL
METABOLISMO MICROBIANO RUMINAL

MILK FATTY ACIDS DERIVED FROM RUMEN MICROBIAL METABOLISM

Tesis doctoral presentada por
ANA CABELLO SALINAS

Directores
ANDRÉS MARTÍNEZ MARÍN
PILAR GÓMEZ CORTÉS

Fecha de depósito tesis en el Idep
31 octubre de 2019

TITULO: *ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE PROCEDENTES
DEL METABOLISMO MICROBIANO RUMINAL*

AUTOR: *Ana Cabello Salinas*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio de los ácidos grasos de la leche procedentes del metabolismo microbiano ruminal

DOCTORANDA: Ana Cabello Salinas

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis titulada "*Estudio de los ácidos grasos de la leche procedentes del metabolismo microbiano ruminal*" redactada por Doña Ana Cabello Salinas se ha desarrollado desde el año 2015 en distintas etapas de acuerdo con los principios que rigen el trabajo científico y la formación de los doctorandos. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento sobre las relaciones entre los ácidos grasos de la leche derivados directa o indirectamente de las bacterias ruminales y el efecto que la ración puede tener sobre dichos ácidos grasos, con especial atención a los cambios a lo largo del tiempo.

Con los resultados obtenidos, hasta la fecha se ha publicado un trabajo en la Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Asimismo, se han presentado sendas comunicaciones en el XX Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia y en el III Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Emprendimiento de la Universidad de Bolívar (Ecuador).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 20 de Septiembre de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: Andrés Luis Martínez Marín

Fdo.: Pilar Gómez Cortés



Contenido

FIGURAS	9
TABLAS	11
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	15
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
1. LÍPIDOS DE LA LECHE	19
1.1. Ácidos grasos mayoritarios	21
1.2. Ácidos grasos minoritarios	22
2. ÁCIDOS GRASOS DE NUMERO DE CADENA IMPAR Y RAMIFICADA.....	24
2.1. Origen de los ácidos grasos de cadena impar y ramificada en leche	24
2.2. Influencia de la dieta del ganado sobre los contenidos de OBCFA.....	32
2.3. Ácidos grasos ramificados como componentes bioactivos.....	36
2.4. Ácidos grasos de cadena impar como componentes bioactivos	40
3. ÁCIDOS GRASOS TRANS.....	41
3.1. Definición	41
3.2. Origen de los ácidos grasos trans	41
3.3. Origen del ácido linoleico conjugado	43
3.4. Influencia de la dieta del ganado sobre AGT y CLA	45
3.5. Ácidos grasos trans y salud. Evidencias científicas.....	50
3.6. El ácido ruménico como componente bioactivo de la leche	53
4. LA LECHE DE CABRA	56
OBJETIVOS.....	59

CAPÍTULO 1	61
RESUMEN.....	63
INTRODUCCIÓN	65
MATERIAL Y MÉTODOS	67
Diseño experimental.....	67
Extracción y análisis de la grasa láctea	68
Análisis estadístico	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
Características experimentales y datos utilizados.....	70
Relaciones entre los ácidos grasos de la grasa láctea.....	72
CONCLUSIONES.....	77
CAPÍTULO 2	79
RESUMEN	81
INTRODUCCIÓN.....	83
MATERIAL Y MÉTODOS.....	84
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO 3	91
RESUMEN.....	93
INTRODUCCIÓN	95
MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
Animales y dietas.....	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	104
Ácidos grasos impares y ramificados	104
CONCLUSIONES.....	117
CONCLUSIONES	119
RESUMEN.....	123
ABSTRACT	127
BIBLIOGRAFÍA.....	129

Figuras

- FIGURA 0.1. Proyección de Fisher de una molécula de triacilglicérido con 3 ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3. 20
- FIGURA 0.2. Moléculas (de izquierda a derecha) de 16:0 (ácido palmítico), *cis*-9 16:1 y *trans*-9 16:1. 23
- FIGURA 0.3. Rutas metabólicas para la síntesis microbiana de ácidos grasos de cadena impar y ramificada (adaptado de Vlaeminck *et al.*, 2006a). 26
- FIGURA 0.4. Síntesis de novo de ácidos grasos en células epiteliales de la glándula mamaria de rumiantes (adaptado de Chilliard *et al.*, 2001). 29
- FIGURA 0.5. Relaciones iso 15:0/ anteiso 15:0 e iso 17:0/ anteiso 17:0 en bacterias ruminales (trama blanca), fluido duodenal (trama gris) y leche (trama negra) (adaptado de Fievez *et al.*, 2012)). 30
- FIGURA 0.6. Perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena ramificada encontrados en el vérnix (trama blanca) y en el meconio (trama negra). ai: anteiso; i: iso; Me: metil ramificado; diMe: dimetil ramificados; * p < 0.05 (adaptada de Ran-Ressler *et al.*, 2007). 38
- FIGURA 0.7. Distribución de los isómeros *trans* 18:1 en grasa láctea de (A) cabra, (B) vaca, (C) Mujer y (D) grasa vegetal hidrogenada. El eje de abscisas muestra la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada. Tomada de Shingfield *et al.* (2008). 42
- FIGURA 0.8. Rutas metabólicas de formación de *cis*-9 *trans*-11 18:2 (ácido ruménico) en grasa láctea de rumiantes a partir de ácido linoleico y ácido α -linoléico. 45
- FIGURA 0.9. Vías metabólicas de transformación del ácido linoleico en el rumen. Las flechas con línea continua indican las rutas principales confirmadas mientras las líneas discontinuas indican rutas putativas. Tomada de Ferlay *et al.* (2017). 46
- FIGURA 0.10. Vías metabólicas de transformación del ácido α -linoléico en el rumen. Las flechas con línea continua indican las rutas principales confirmadas mientras las líneas discontinuas indican rutas putativas. Tomada de Ferlay *et al.* (2017). 47

FIGURA 0.11. Efectos beneficiosos del ácido linoleico conjugado (CLA) observados en experimentos in vitro y con modelos animales. Tomada de De la Fuente y Juárez (2004).	52
FIGURA 0.12. Estructura química del <i>trans</i> -11 18:1, <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 y del <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 18:2. Tomada de Gómez-Cortés y De la Fuente y Juárez (2010).	54
FIGURA 0.13. Mecanismos de acción del <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 (ácido ruménico, AR) en el metabolismo celular. AA: ácido araquidónico (20:4 n-6); COX: ciclooxigenasa; AL: ácido linoleico (18:2 n-6); LOX: lipoxigenasa; PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisómicos; AV: ácido vacénico (<i>trans</i> -11 18:1). Tomada de Gómez-Cortés <i>et al.</i> (2018).	55
FIGURA 0.14. Entregas de leche en España durante el año 2017 (millones de Tm) y distribución entre especies de rumiantes. Fuente: Federación Española de Industrias Lácteas (FENIL, 2017).	58
FIGURA 2.1. Gráfico de las puntuaciones discriminantes de las observaciones individuales para cada uno de los tratamientos en las dos primeras funciones canónicas (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino)	88
FIGURA 3.1. Esquema del tratamiento de muestra previo a la caracterización de su perfil lipídico.....	102
FIGURA 3.2. Contenido de los ácidos grasos <i>iso</i> 14:0 e <i>iso</i> 16:0 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.....	107
FIGURA 3.3. Evolución temporal los ácidos grasos <i>trans</i> -9 18:1, <i>trans</i> -10 18:1, <i>trans</i> -11 18:1 y <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino. * Indica diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos experimentales dentro de cada día de muestreo. EEM = error estándar de la media.....	110
FIGURA 3.4. Regresión lineal entre los contenidos de <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 y <i>trans</i> -11 18:1 en grasa de leche de cabra procedente de los 4 tratamientos experimentales.....	111
FIGURA 3.5. Ruta de biohidrogenación principal y alternativa del ácido α -linolénico (<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3) en el rumen.....	112
FIGURA 3.6. Evolución temporal los ácidos grasos <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2 y <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:3 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.	114
FIGURA 3.7. Separación cromatográfica de los isómeros <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2 y <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -15 18:2 en grasa láctea caprina con dos columnas capilares complementarias de 100 m (CP-Sil88 y SLB-IL111).	115
FIGURA 3.8. Contenido de los ácidos grasos <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -15 18:2, <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2 y <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:3 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.....	116

Tablas

TABLA 0.1. Contenido de las principales clases de lípidos en la grasa láctea de distintas especies de rumiantes (Datos tomados de Gordon, 2013).	19
TABLA 0.2. Contenido de los distintos tipos de fosfolípidos en distintas especies de rumiantes (Datos tomados de MacGibbon y Taylor, 2006).	20
TABLA 0.3. Composición media de los ácidos grasos mayoritarios en leches de vaca, oveja y cabra (Datos tomados de Gómez-Cortés <i>et al.</i> , 2018).....	21
TABLA 0.4. Perfil de ácidos grasos de cadena ramificada en productos lácteos (Datos tomados de Gómez-Cortés <i>et al.</i> 2018).....	22
TABLA 0.5. Composición media de ácidos grasos ramificados y de cadena impar minoritarios de menos de 14 átomos de carbono presentes en leche de cabra.....	25
TABLA 0.6. Contenido en iso 15:0, anteiso 15:0, iso 17:0, anteiso 17:0 y relaciones iso15:0/ anteiso 15:0 e iso 17:0/anteiso 17:0 en fluido duodenal, leche así como en triacilglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) del plasma sanguíneo de vacas en dos experimentos llevados a cabo modificando la proporción de fibra y almidón (Ensayo 1) y el nivel de nitrógeno de la dieta (adaptada de Vlaeminck <i>et al.</i> 2015).....	31
TABLA 0.7. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados (g/100g de ácidos grasos totales) en leche de vacas alimentadas con ensilado de pasto o maíz (Shingfield <i>et al.</i> , 2005; Vlaeminck <i>et al.</i> , 2006a) y con varios niveles de ensilado de pasto en la dieta (Patel <i>et al.</i> , 2013), y en leche de cabras alimentada con distintos niveles de fibra en las raciones (Li <i>et al.</i> 2014b) y con distintas relaciones fibra/almidón en la dieta (Cívico <i>et al.</i> , 2017).....	33
TABLA 0.8. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados en leche de vaca (Dewhurst <i>et al.</i> , 2007; Vazirigochar <i>et al.</i> , 2018) y oveja (Gómez-Cortés <i>et al.</i> , 2011) con distintas proporciones de forraje/concentrado (F/C) en la dieta base.....	35
TABLA 0.9. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados (g/100g de ácidos grasos totales) en leche de ovejas alimentadas sin suplementación lipídica (control) y con dietas suplementadas con 17, 34 y 61 g/Kg de materia seca (MS) con aceite de girasol (Gómez-Cortés <i>et al.</i> 2011) y cabras alimentadas sin suplementación lipídica y con dietas suplementadas con 48 g/día de aceite rico en ácido oleico (girasol altoleico), linoleico (girasol) y α -linolénico (lino) (Martínez Marín <i>et al.</i> , 2011).....	37

TABLA 0.10. Contenido mínimo y máximo (% de ácidos grasos totales) de isómeros del ácido linoleico conjugado individuales en leche de vaca, oveja y cabra. Los datos han sido tomados de Ferlay <i>et al.</i> (2017) ¹ y Shingfield <i>et al.</i> (2013) ² . NR: no reportado.	44
TABLA 0.11. Composición media e intervalos de variación de sólidos totales, grasa, proteína, caseína, lactosa y cenizas de leche de cabra (Porcentaje en peso). Los datos han sido tomados de Amigo y Fontecha (2011).....	57
TABLA 1.1. Composición de las dietas utilizadas en los experimentos incluidos en el estudio (CON, dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).....	69
TABLA 1.2. Estadísticos descriptivos (media ± desviación típica y rango) de los contenidos de ácidos grasos intermediarios de la biohidrogenación ruminal (expresados en g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) en las muestras de grasa láctea incluidas en el estudio (CON, dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).....	71
TABLA 1.3. Estadísticos descriptivos (media ± desviación típica y rango) de los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados (expresados en g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) en las muestras de grasa láctea incluidas en el estudio (CON, dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).....	73
TABLA 1.4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea de cabras. Solamente se presentan las correlaciones significativas (P<0,05).	75
TABLA 2.1. Composición de las raciones utilizadas (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).	85
TABLA 2.2. Resultados del análisis discriminante (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).	87
TABLA 2.3. Funciones discriminantes de Fisher y tasas de acierto con la matriz original y tras la validación cruzada (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).	89
TABLA 3.1. Ingredientes, composición química y valor nutritivo de las 4 dietas experimentales ensayadas.....	99
TABLA 3.2. Perfil de ácidos grasos del aceite de lino incorporado en las raciones (g/100 g de ácidos grasos totales).	100
TABLA 3.3. Listado de ácidos grasos no resueltos con la columna CP-Sil 88 (CP) y posteriormente discriminados con la columna SLB-IL111 (SL).....	103
TABLA 3.4. Contenidos (g /100 g de ácidos grasos totales) de ácidos grasos impares y ramificados en grasa láctea de cabras alimentadas con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino....	106
TABLA 3.5. Contenidos (g / 100 g de ácidos grasos totales) de ácidos grasos <i>trans</i> en grasa láctea de cabras alimentadas con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.	109

Abreviaturas

AG: ácido graso
AGS: ácido graso sintetasa
AGL: ácidos grasos libres
AGS: ácido graso sintetasa
AGT: ácidos grasos trans
AR: ácido ruménico cis-9 trans-11 18:2
AV: ácido vacénico trans-11 18:1
BCFA: ácidos grasos de cadena ramificada
BHR: biohidrogenación ruminal
CLA: ácido linoleico conjugado
EC: ésteres de colesterol
ECV: enfermedades cardiovasculares
EFSA: European Food Safety Authority
F/C: relación forraje concentrado
FL: fosfolípido
OBCFA: ácidos grasos de número impar de átomos de carbono y cadena ramificada
OCFA: ácidos grasos de número impar de átomos de carbono
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
TG: triacilglicéridos
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad



Introducción y justificación

La grasa de la leche de las hembras rumiantes se distingue de las de otros mamíferos terrestres por contener más de 400 ácidos grasos. La diversidad de ácidos grasos es debida al metabolismo lipídico de los microorganismos ruminales y la actividad enzimática de la glándula mamaria. La grasa láctea contiene ácidos grasos singulares procedentes de la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta y de la síntesis de novo bacteriana a partir de los ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación ruminal de los carbohidratos y los aminoácidos. El aporte de estos ácidos grasos a la dieta humana depende, casi exclusivamente, de la grasa láctea y han despertado gran interés en los últimos años porque numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y con modelos animales señalan que algunos de ellos pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud humana. Entre otros ejemplos, los ácidos grasos iso y anteiso tienen la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de varias líneas de células tumorales, incluyendo las de cáncer de mama. Al ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) se le atribuyen numerosos efectos positivos en el organismo humano, destacando los efectos antitumoral, antiaterosclerótico y antihipertensivo. Al ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11), además de ser precursor del ácido ruménico en el organismo, se le reconocen efectos positivos sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos descubrimientos han propiciado un creciente interés por la manipulación del perfil de ácidos grasos de la grasa láctea mediante la modificación de las características y la composición de la dieta ofrecida a los animales, especialmente la inclusión de fuentes de grasa vegetales ricas en ácidos grasos insaturados. Así mismo, las relaciones entre los isómeros de la biohidrogenación ruminal y los ácidos grasos impares y pueden usarse como indicador no invasivo de los efectos de la dieta sobre las bacterias ruminales.

La presencia de ácidos grasos mono y poliinsaturados, derivados de la biohidrogenación ruminal y con diferentes isomerías posicionales y geométricas,

en la grasa láctea se relaciona directamente con los ácidos grasos insaturados mayoritarios en la dieta consumida por los animales.

El bajo punto de fusión de los ácidos grasos impares y ramificados (sintetizados a partir de ácidos grasos volátiles producidos en la fermentación ruminal) hace que sean incorporados preferentemente en las membranas celulares microbianas para contribuir al mantenimiento de su fluidez y la proporción de cada uno de ellos en los lípidos microbianos que llegan al intestino delgado puede considerarse un reflejo de las poblaciones microbianas del rumen.

Dado que la dieta consumida puede tener efectos simultáneos sobre los isómeros de la biohidrogenación ruminal y los ácidos grasos impares y ramificados, sus contenidos en la grasa láctea podrían utilizarse como biomarcadores de las características de la dieta y del efecto de la composición de esta sobre el ambiente ruminal. Estudios previos han mostrado que los ácidos grasos de la leche podrían utilizarse como predictores del tipo de aceite vegetal consumido por cabras, pero la información concerniente a grupos concretos de ácidos grasos relacionados con el metabolismo lipídico microbiano es escasa.

Establecer las relaciones de los isómeros de la biohidrogenación ruminal con los ácidos grasos impares y ramificados de los lípidos bacterianos en la grasa láctea sería clave para interpretar el impacto de la dieta suministrada al rumiante sobre las poblaciones microbianas del rumen y su repercusión en los atributos nutritivos de la grasa de la leche y sus productos derivados.

Revisión bibliográfica



1. LÍPIDOS DE LA LECHE

Los lípidos se encuentran entre los constituyentes más importantes de la leche, tanto por razones nutritivas y económicas como por las características físicas y organolépticas que proporcionan a los productos lácteos. Los triacilglicéridos (en adelante **TG**) son los componentes mayoritarios (más del 95%), (**Tabla 0.1**). La leche también contiene otros lípidos más simples (diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ésteres de colesterol y ceras) y más complejos (mayoritariamente fosfolípidos) además de una fracción insaponificable, donde se encuentran el colesterol, carotenoides, vitaminas (A, D, E y K), antioxidantes y escualeno, todos ellos en pequeñas cantidades.

TABLA 0.1. Contenido de las principales clases de lípidos en la grasa láctea de distintas especies de rumiantes (Datos tomados de Gordon, 2013).

Clase de lípido	VACA	% de lípidos totales	
		OVEJA	CABRA
Triacilglicéridos	98,3	98,1	97,3
Diacilglicéridos	0,30	1,45a	1,89a
Monoacilglicéridos	0,03	0,03	0,10
Ácidos grasos libres	0,1	-	-
Fosfolípidos	0,8	0,38	0,65
Insaponificable	1,5	NR	NR
Esteroles	0,30	0,30	0,36

a Incluye ácidos grasos libres.

NR: no reportados.

Los lípidos se encuentran físicamente en forma de glóbulos, con un diámetro variable entre 1 y 10 μm , formando una emulsión con la fase acuosa de la leche, lo que facilita su hidrólisis por las enzimas digestivas. Cada glóbulo de grasa está constituido por un núcleo hidrofóbico compuesto por ácidos grasos (**AG**) que se hallan mayoritariamente esterificados en cada una de las tres posiciones

de la molécula de TG (**Figura 0.1**). Los TG son insolubles en agua, ricos en energía metabólica y se encuentran rodeados por una membrana de naturaleza lipoproteica, constituida mayoritariamente por fosfolípidos (**FL**) y colesterol, que los protege de la acción de enzimas lipolíticas. Los FL más abundantes son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomiolina (**Tabla 0.2**) que contienen AG mono y poliinsaturados (**PUFA**) en cantidades variables.

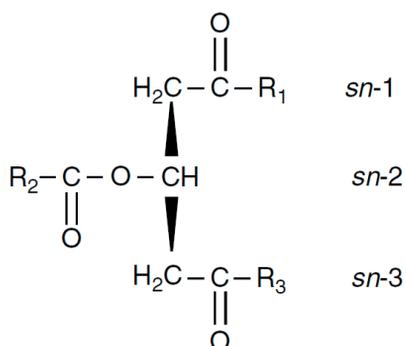


FIGURA 0.1. Proyección de Fisher de una molécula de triacilglicérido con 3 ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3.

TABLA 0.2. Contenido de los distintos tipos de fosfolípidos en distintas especies de rumiantes (Datos tomados de MacGibbon y Taylor, 2006).

Clase de Fosfolípido	VACA	OVEJA	CABRA
	% de fosfolípidos totales		
Fosfatidiletanolamina	32	36	33
Fosfatidilinositol	5	3	6
Fosfatidilserina	3	3	7
Fosfatidilcolina	35	29	26
Esfingomiolina	25	28	28

1.1. ÁCIDOS GRASOS MAYORITARIOS

Los TG, al ser mayoritarios, son los principales responsables de las propiedades de los lípidos lácteos. Estas características varían en función de la composición de AG, ya que estos representan más del 90% de la masa de los TG. Aunque la leche contiene más de 400 AG diferentes (Jensen, 2002; Schroder y Vetter, 2013), apenas 30 o 40 están presentes en concentraciones superiores al 0.10%; el resto figura en cantidades más bajas. El perfil de AG de la grasa láctea depende de la especie de rumiante, y se puede modificar, sobretodo, con la alimentación del ganado. Factores de tipo genético (raza, individuo), rendimiento lechero y el estado de lactación ejercen, en comparación, una influencia menor.

TABLA 0.3. Composición media de los ácidos grasos mayoritarios en leches de vaca, oveja y cabra (Datos tomados de Gómez-Cortés *et al.*, 2018).

Ácido Graso	VACA	OVEJA	CABRA
	% de ácidos grasos totales		
4:0	3.9	3.5	2.2
6:0	2.5	2.9	2.4
8:0	1.5	2.6	2.7
10:0	3.2	7.8	10.0
12:0	3.6	4.4	5.0
14:0	11.1	10.4	9.8
15:0	1.2	1.0	0.7
16:0	27.9	25.9	28.2
17:0	0.6	0.6	0.7
18:0	12.2	9.6	8.9
cis 18:1	17.2	18.2	19.3
trans 18:1	3.9	2.9	2.1
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	1.4	2.3	3.2
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 18:3	1.0	0.8	0.4

Los AG de la leche pueden ser saturados o insaturados (de uno a cuatro dobles enlaces). La mayor parte de los AG saturados contienen un número par de átomos de carbono, siendo los mayoritarios desde el butírico (4:0) al esteárico (18:0) (**Tabla 0.3**). Aunque los AG saturados más abundantes son los que tienen una longitud de cadena de 10 a 18 átomos de carbono la grasa de leche

de rumiantes se caracteriza por la presencia de cantidades importantes de AG de cadena corta, especialmente butírico (4:0) y caproico (6:0), que están casi ausentes de la leche de otros mamíferos. La presencia de estos AG de cadena corta contribuye a disminuir el punto de fusión de la grasa láctea, relativamente saturada, facilitando de esta forma su secreción a través de la glándula mamaria.

Dentro del grupo de AG insaturados el más abundante es el ácido oleico (*cis*-9 18:1) que, cuantitativamente, es el segundo más importante de la leche. La presencia en la leche de pequeñas cantidades, mucho menores que las de ácido oleico, de ácidos linoleico (*cis*-9, *cis*-12 18:2) y α -linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3) es particularmente interesante (**Tabla 0.3**) puesto que el organismo humano no es capaz de sintetizarlos y, por tanto, se consideran constituyentes esenciales de la dieta.

Tabla 0.4. Perfil de ácidos grasos de cadena ramificada en productos lácteos (Datos tomados de Gómez-Cortés *et al.* 2018).

Ácido Graso	Leche	Mantequilla	Yogurt	Nata	Queso
% de ácidos grasos totales					
iso 13:0	0.04	NR	NR	NR	NR
anteiso 13:0	0.08	NR	NR	NR	NR
iso 14:0	0.09	0.17	0.12-0.13	0.00-0.05	0.00-0.22
iso 15:0	0.22	0.01	0.14-0.15	0.00-0.11	0.02-0.42
anteiso 15:0	0.46	0.63	0.62-0.63	0.46-0.49	0.38-0.88
iso 16:0	0.21	0.34	0.29-0.30	0.24	0.00-1.18
iso 17:0	0.27	0.31	0.16-0.25	0.27-0.30	0.05-0.30
anteiso 17:0	0.50	0.38	0.56-0.59	0.36-0.37	0.29-0.61
iso 18:0	NR	<0.01	0.00-0.04	<0.01	0.00-0.09

NR: no reportados

1.2. ÁCIDOS GRASOS MINORITARIOS

Junto a los AG descritos anteriormente, la leche contiene también otros, que, aunque minoritarios, poseen también gran relevancia. Entre estos cabe destacar los ácidos grasos de número impar de átomos de carbonos y cadena ramificada (**OBCFA**) y los insaturados con doble enlace con configuración geométrica *trans*. Todos ellos tienen un nexo común: su origen mayoritario reside en los procesos fermentativos de los alimentos que tienen lugar en el rumen. Los AG saturados con número impar de átomos de carbono (**OCFA**)

representan un 2% del total de AG, siendo 15:0 y 17:0 los más abundantes y representativos (**Tabla 0.3**). Los AG saturados de cadena ramificada (**BCFA**) se encuentran en una proporción similar pero engloban a un mayor número de moléculas con concentraciones variables (**Tabla 0.4**). Aunque en conjunto los niveles en grasa láctea de OBCFA están en torno al 4%, su interés va más allá, porque se utilizan como herramienta de diagnóstico para determinar si existe un correcto funcionamiento de la cavidad ruminal y, en humanos, algunos como indicadores de la ingesta de productos lácteos. Los BCFA además, en comparación a sus homólogos no ramificados, presentan puntos de fusión más bajos, especialmente los *anteisos*, característica que los permite contribuir a mantener la necesaria fluidez de la grasa láctea.

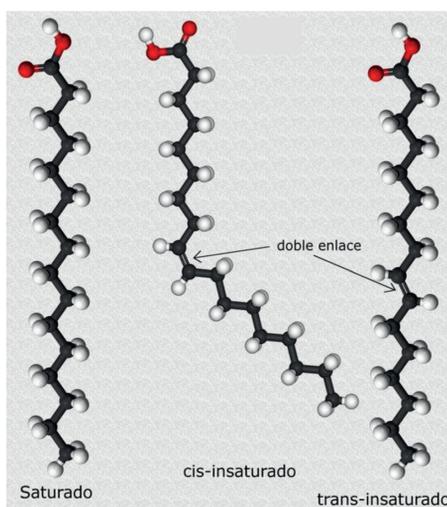


FIGURA 0.2. Moléculas (de izquierda a derecha) de 16:0 (ácido palmítico), *cis*-9 16:1 y *trans*-9 16:1.

En términos generales, los AG insaturados de las grasas de origen vegetal y buena parte de origen animal poseen dobles enlaces provistos de configuración *cis*. Sin embargo, los AG *trans* (**AGT**) también se encuentran de forma natural en alimentos derivados de rumiantes, como la carne, el queso o la leche. Los dobles enlaces *cis* producen acodaduras en la cadena alifática carbonada, formando un ángulo de 30°, a diferencia de la configuración *trans* que se asemeja a la forma extendida característica de las cadenas saturadas (**Figura 0.2**). Esta característica espacial condiciona las propiedades físicas y químicas de estas moléculas. La grasa láctea contiene entre 1-5% de AGT de los cuales los monoinsaturados son los más abundantes. El perfil isomérico de estos AG es muy

variable y está influido de forma decisiva por la dieta, especialmente por la cantidad y el tipo de grasa de la ingesta. A su vez este perfil puede ejercer una influencia importante sobre las características nutricionales de la grasa láctea tal como se expondrá con más detalle en apartados posteriores.

2. ÁCIDOS GRASOS DE NÚMERO DE CADENA IMPAR Y RAMIFICADA

2.1. ORIGEN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA IMPAR Y RAMIFICADA EN LECHE

Una de las peculiaridades de la grasa de leche de rumiantes respecto a la de otros mamíferos, es la presencia de niveles destacados de OBCFA. Los principales OBCFA son isómeros de los ácidos tridecanoico (*iso* 13:0), tetradecanoico (*iso* 14:0), pentadecanoico (15:0, *iso* 15:0 y *anteiso* 15:0), hexadecanoico (*iso* 16:0), heptadecanoico (17:0, *iso* 17:0 y *anteiso* 17:0) y octadecanoico (*iso* 18:0). Vlaeminck *et al.* (2006a) recopilaron los datos de numerosos estudios sobre la composición de OBCFA en leche. En conjunto, y dentro de un esquema de gran variabilidad, los OCFA representan casi la mitad de los OBCFA de los productos lácteos seguidos por los BCFA *anteiso* (**Tabla 0.4**). La leche de cabra es particularmente rica en estos AG. Además, posee también pequeñas cantidades de otros BCFA (monometilos y dimetilos) con longitud de cadena menor de 14 átomos de carbonos (**Tabla 0.5**) que apenas están presentes en leche de otros rumiantes (Alonso *et al.*, 1999; Martínez Marín *et al.* 2011).

2.1.1. SÍNTESIS RUMINAL DE ácidos grasos de cadena impar y ramificada

Los OBCFA se sintetizan principalmente en la cavidad ruminal por la acción de las enzimas de los microorganismos allí presentes. Las bacterias ruminales contienen entre 50-90 g/kg de lípidos en su materia seca, y alrededor de un 5% de los AG totales son OBCFA. Estos se localizan preferentemente en las membranas (Buccioni *et al.*, 2012). Los protozoos poseen menos OBCFA totales que las bacterias (110 vs. 160 g/kg de AG totales), aunque presentan una mayor proporción de *iso* 16:0 y *anteiso* 17:0 (Or-Rashid *et al.*, 2007).

TABLA 0.5. Composición media de ácidos grasos ramificados y de cadena impar minoritarios de menos de 14 átomos de carbono presentes en leche de cabra.

Ácido Graso	Alonso <i>et al.</i>	Martínez Marín <i>et al.</i>
	(1999)	(2011)
mg/g de ácidos grasos totales		
2-metil 4:0	0.005	
3-metil 4:0	0.023	
2 etil 4:0	0.004	
3-metil 5:0	0.025	
4-metil 5:0	0.017	
2-etil 6:0	0.007	
4-metil 6:0	0.050	
Metil 7:0	0.054	
2,4 dimetil 7:0	0.051	
4-metil 8:0	0.391	0.470
6-metil 8:0	0.041	
4-etil 8:0	0.227	
4-etil 9:0	0.016	
8-etil 9:0	0.036	
Metil 10:0	0.703	0.780
2-etil 10:0	0.322	
Dimetil 10:0	0.310	
4-metil 12:0	0.135	0.260
5:0	0.134	0.250
7:0	0.363	0.460
9:0	0.915	1.020

Los OCFA de cadena media (13:0, 15:0, 17:0) son sintetizados por los microorganismos digestivos a partir de ácido propiónico, aunque 15:0 y 17:0 también pueden originarse por α -oxidación de 16:0 y 18:0, respectivamente (**Figura 0.3**). Los precursores de los BCFA del rumen son los aminoácidos ramificados de la dieta, la valina, leucina e isoleucina. La microbiota ruminal transforma estos tres aminoácidos en ácidos carboxílicos ramificados, isobutírico, isovalérico y 2-metil-butírico, respectivamente (**Figura 0.3**) que son las moléculas a partir de las cuales se sintetizan los distintos BCFA. Los *iso* de cadena par lo hacen a

partir del ácido isobutírico, mientras que los *iso* y *anteiso* de cadena impar se generan de los ácidos isovalérico y 2-metil-butírico, respectivamente (**Figura 0.3**).

El perfil de OBCFA que abandona el tracto digestivo de rumiantes está más ligado a la actividad de la enzima ácido graso sintetasa (AGS) de los microorganismos presentes que a la disponibilidad de sustrato para la misma (Vlaeminck *et al.*, 2006a). De ahí, que la variación en el perfil de OBCFA sea más un reflejo de la abundancia relativa de las distintas especies de microorganismos que conforman el ecosistema ruminal que de alteraciones en la propia síntesis de AG (Bas *et al.*, 2003; Baumann *et al.*, 2016).

Las bacterias celulolíticas, como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* o *Butyrivibrio fibrisolvens* poseen contenidos más elevados de OBCFA *iso* (Fievez *et al.*, 2012). La mayor proporción de *anteiso* 15:0 indicaría la presencia de bacterias especializadas en la fermentación de pectina y azúcares (Vlaeminck *et al.*, 2006a; Bessa *et al.*, 2009) como *Prevotella* spp., *Lachnospira multiparus* and *Succinovibrio dextrinosolvens*. Bacterias amilolíticas o digestoras de almidón como *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Succinimonas amylolytica*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* and *Streptococcus bovis* poseen niveles bajos de BCFA pero, en contraste, están enriquecidas en OCFA de cadena impar (Vlaeminck *et al.*, 2006a).

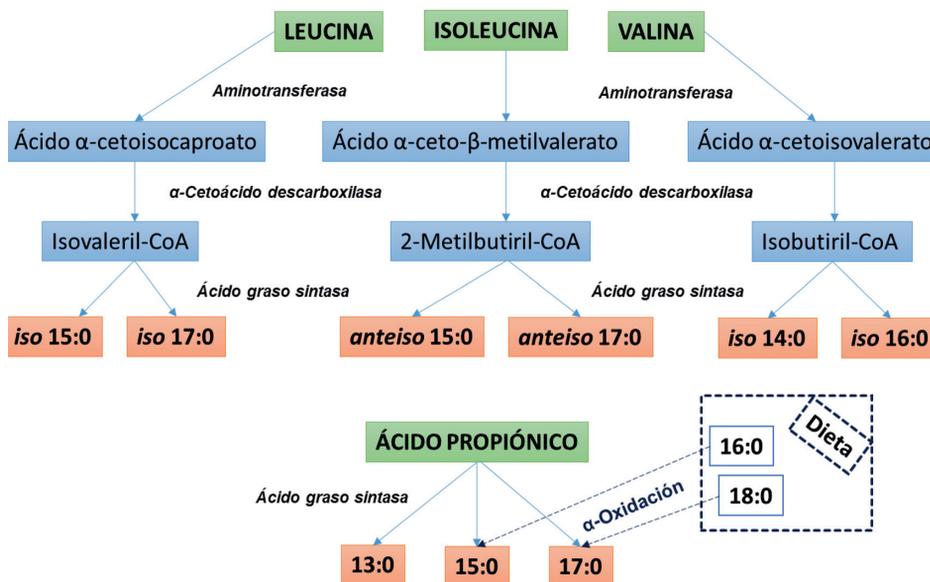


FIGURA 0.3. Rutas metabólicas para la síntesis microbiana de ácidos grasos de cadena impar y ramificada (adaptado de Vlaeminck *et al.*, 2006a).

2.1.2. TRANSFERENCIA DE OBCFA DESDE EL INTESTINO A LA GLÁNDULA MAMARIA

La idea que atribuye la presencia de OBCFA en productos lácteos a los microorganismos presentes en la cavidad ruminal es muy antigua (Keeney *et al.*, 1962) y ha sido plenamente aceptada por la comunidad científica. Sin embargo, este hecho no garantiza que el perfil de OBCFA de la leche sea sólo un reflejo directo de la actividad de la microbiota ruminal. De hecho, algunos trabajos publicados más recientemente (Vlaeminck *et al.*, 2006a; Dewhurst *et al.*, 2007) han cuestionado que esa correlación entre el contenido de OBCFA en el fluido intestinal y la grasa láctea sea tan estrecha. Tales desajustes se podrían generar durante la transferencia de estos AG desde el aparato digestivo a los tejidos internos, particularmente a la glándula mamaria, y podrían tener lugar como consecuencia del proceso de absorción intestinal o durante el transporte a través del torrente sanguíneo.

Al igual que otros AG que alcanzan el intestino delgado los OBCFA son absorbidos en el yeyuno. Aparentemente la absorción intestinal de los AG de origen microbiano sería más alta que la de otros (Schmidely *et al.*, 2008) pero los pocos datos de los que se dispone no son suficientes para emitir una conclusión definitiva.

Tras su absorción por las células epiteliales intestinales, los OBCFA, como otros AG, son esterificados en los TG y FL. A continuación, son transportados, primero al sistema linfático y posteriormente al torrente sanguíneo formando parte de complejos macromoleculares como quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Finalmente, el acceso al citoplasma de las células de la glándula mamaria de los AG se realiza una vez liberados de dichas macromoléculas, por acción de la enzima lipoproteína lipasa (**Figura 0.4**). Tanto quilomicrones como partículas VLDL contienen TG, FL, ésteres de colesterol (**EC**) y ácidos grasos libres (**AGL**) pero cada una de estas clases de lípidos difieren en composición puesto que cada tipo de AG se enlaza selectivamente a las mismas.

Es bien conocido que la principal diana de la lipoproteína lipasa de la glándula mamaria son los AG que forman parte de los TG del plasma. Por el contrario, aquellos AG característicos de las fracciones de CE y FL se transfieren más pobremente a la grasa de leche debido a la baja afinidad de dicha enzima por ellas. Fievez *et al.* (2012) reportaron que los BCFA son más abundantes en los EC y los TG que en los FL o los AGL. Estas dos últimas fracciones lipídicas, en contraste, son más ricas en OCFA. Sin embargo, la literatura disponible sobre la distribución de los OBCFA entre los diferentes tipos de lípidos del plasma es aún escasa para predecir tendencias o pronosticar comportamientos metabólicos sólidos. Por tanto, merecería la pena explorar los procesos meta-

bólicos que tienen lugar en la glándula mamaria para encontrar los mecanismos responsables de las diferencias entre los perfiles de OBCFA entre fluidos digestivos y leche a las que se ha hecho anteriormente alusión.

2.1.3. Síntesis endógena DE OBCFA EN LA GLÁNDULA MAMARIA Y OTROS TEJIDOS

La mayor parte de los AG saturados de número par de átomos de carbono presentes en la grasa láctea de rumiantes, desde el 6:0 al 16:0 se sintetizan *de novo* en las células epiteliales de la glándula mamaria (Palmquist, 2006). La síntesis de los mismos se produce a partir de las moléculas de acetato y del β -hidroxibutirato circulantes en el torrente sanguíneo, generadas en el rumen durante la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta. Las dos enzimas principales responsables de esta síntesis *de novo* en la glándula mamaria son la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la AGS (**Figura 0.4**). El primer paso de la síntesis consiste en la activación del acetato a acetil CoA seguida de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar malonil CoA. Esta etapa es catalizada por la ACC. A continuación, la AGS regula la elongación de cadena de los AG sintetizados *de novo*. Si el sustrato inicial en lugar del acetato fuese propionato, su derivado el metilmalonato, o AG volátiles ramificados (isovalérico, isobutírico y 2-metilbutírico), los productos finales de la síntesis *de novo* serían potencialmente OCFA, AG con metilo no terminales, o *iso* y *anteiso*, respectivamente (Palmquist, 2006).

Los primeros trabajos llevados a cabo en este campo demostraron que 15:0 y 17:0 podrían ser sintetizados *de novo* en la glándula mamaria utilizando propionil-CoA en lugar de acetil-CoA como molécula iniciadora (Massart-Leën *et al.*, 1983). La elongación de dicha molécula catalizada por la AGS explicaría la presencia en leche de 5:0, 7:0, 9:0 y 11:0 así como el incremento de las cantidades de 13:0, 15:0 y 17:0 respecto a las ya generadas en el rumen y transferidas desde el duodeno. La importancia de esta síntesis endógena se vio confirmada en trabajos posteriores (Dewhurst *et al.*, 2007; French *et al.*, 2012; Vlaeminck *et al.*, 2015). Teóricamente estos OCFA (13:0, 15:0 y 17:0) podrían a su vez ser metabolizados a *cis*-monoinsaturados por acción de la enzima $\Delta 9$ desaturasa. Sin embargo, únicamente la conversión de 17:0 a *cis*-9 17:1 parece tener importancia cuantitativa (Fievez *et al.*, 2003).

En contraste a los OCFA, la síntesis mamaria de *iso* y *anteiso* no respondió al aumento de disponibilidad de propionato ni de AG volátiles ramificados (Massart-Leën *et al.*, 1983; French *et al.*, 2012). Aunque la formación de AG metil sustituidos no terminales se observó en cabras (Massart-Leën *et al.*, 1983), no lo fue en vacas (Croom *et al.*, 1981). En definitiva, el enzima

AGS no sería activa en la elongación de isovaleril-CoA, 2-metilbutiril-CoA o isobutiril-CoA para formar AG *iso* y *anteiso*. Estos resultados estarían, sin embargo, en aparente contradicción con los incrementos en los contenidos de *iso* 17:0 e *anteiso* 17:0 en grasa láctea respecto a su presencia en el fluido intestinal reportados más recientemente por otros autores (Vlaeminck *et al.*, 2006; Dewhurst *et al.*, 2007; Gervais *et al.*, 2011).

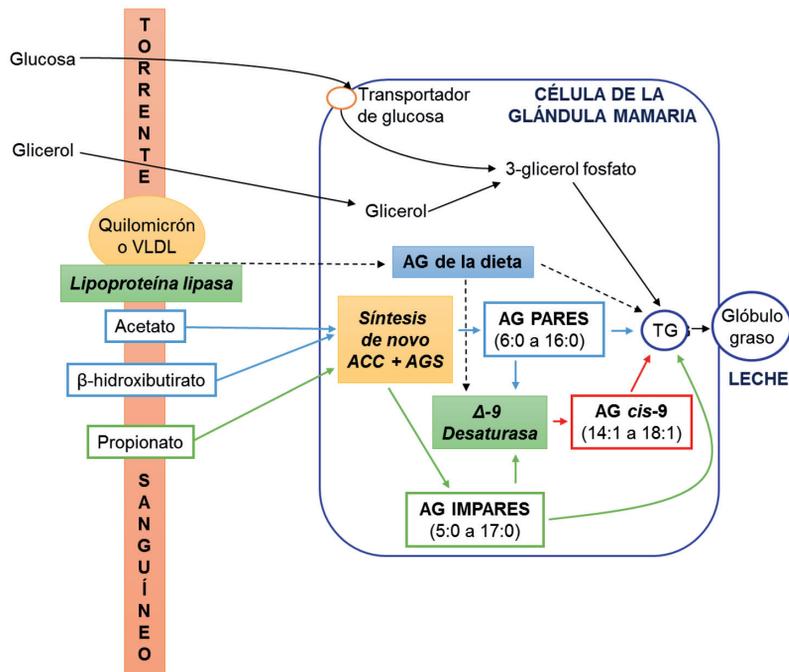


FIGURA 0.4. Síntesis de novo de ácidos grasos en células epiteliales de la glándula mamaria de rumiantes (adaptado de Chilliard *et al.*, 2001).

Fievez *et al.* (2012) postularon que los valores más bajos que se desprendían de las relaciones *iso* 15:0/*iso* 17:0 y *anteiso* 15:0/*anteiso* 17:0 en leche comparadas con las de fluido duodenal (Figura 0.5) podrían ser explicadas si se demostrase viable la elongación de cadena de las moléculas de *iso* 15:0 y *anteiso* 15:0 una vez abandonado el tracto digestivo. Parecía llamativo en este sentido que la secreción en la leche de *iso* 15:0 + *iso* 17:0 y *anteiso* 15:0 + *anteiso* 17:0 era muy similar a la suma de estos AG determinada en el duodeno (Fievez *et al.* 2012). Esta información reforzó la hipótesis sobre la existencia de una actividad elongasa extraruminal sobre los AG *iso* y *anteiso* de 15 átomos de carbono y además

apoyó la idea de una transferencia casi completa de los AG ramificados totales desde el duodeno a la leche.

Un estudio posterior llevado a cabo con vacas alimentadas utilizando diferentes dietas (Vlaeminck *et al.*, 2015) confirmó un comportamiento similar (**Tabla 0.6**). Vlaeminck *et al.* (2015) descartaron para explicar los incrementos de *iso* 17:0 y *anteiso* 17:0 en leche frente al fluido duodenal, tanto la síntesis *de novo* postruminal de estos AG como su movilización a partir del tejido adiposo. La observación combinada de una secreción láctea más alta en *iso* 17:0 y *anteiso* 17:0 en comparación con el fluido duodenal y unas relaciones *iso*-15:0/*iso*-17:0 y *anteiso* 15:0/*anteiso* 17:0 más bajas en leche reforzaron la idea de un papel predominante de elongasas post-digestivas que ejercerían su actividad sobre el *iso* 15:0 y *anteiso* 15:0. El valor más bajo de la relación *iso* 15:0/*iso* 17:0 y *anteiso* 15:0/*anteiso* 17:0 en los TG del plasma sanguíneo (**Tabla 0.6**) respecto a las muestras del fluido duodenal sería además indicativo de que la elongación podría tener lugar en tejidos distintos al epitelio mamario.

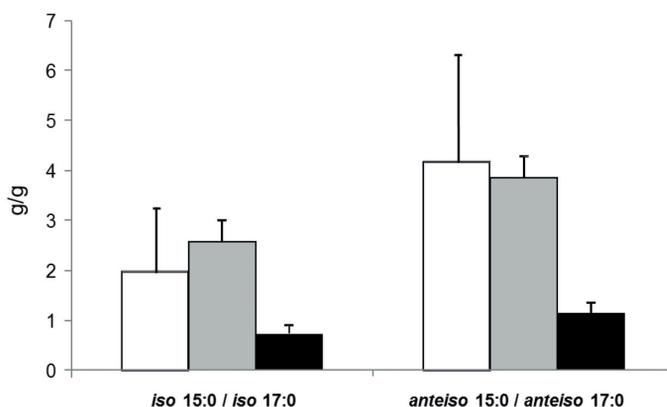


FIGURA 0.5. Relaciones *iso* 15:0/ *anteiso* 15:0 e *iso* 17:0/ *anteiso* 17:0 en bacterias ruminales (trama blanca), fluido duodenal (trama gris) y leche (trama negra) (adaptado de Fievez *et al.*, 2012).

La sobreexpresión del gen que codifica la elongasa ELOVL6 en rumiantes ha sido descrita en células epiteliales mamarias (Xu *et al.*, 2016), y, más recientemente, un estudio *in vitro* ha sido el primero en valorar el papel de esta enzima en la regulación de la elongación de AG (Shi *et al.*, 2017). La sobreexpresión de ELOVL6 aumentaba los índices de elongación de 16:0 y 18:0 sugiriendo un papel importante de esta enzima en el control de longitud

Tabla o.6. Contenido en iso 15:0, anteiso 15:0, iso 17:0, anteiso 17:0 y relaciones iso15:0/anteiso 15:0 e iso 17:0/anteiso 17:0 en fluido duodenal, leche así como en triacilglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) del plasma sanguíneo de vacas en dos experimentos llevados a cabo modificando la proporción de fibra y almidón (Ensayo 1) y el nivel de nitrógeno de la dieta (adaptada de Vlaeminck *et al.* 2015).

PLASMA SANGUÍNEO						
Ácido Graso	Ensayo	DUODENO	LECHE	TAG	AGL	P-value
g/100 g de ácidos grasos impares y de cadena ramificada totales						
iso 15:0	1	12.87d	7.20b	9.13c	6.22 ^a	<0.001
	2	10.45c	5.42 ^a	6.80b	7.54b	<0.001
anteiso 15:0	1	26.98d	14.54b	19.07c	12.47 ^a	<0.001
	2	33.57c	13.22 ^a	15.00ab	19.06b	<0.001
iso 17:0	1	5.76 ^a	8.85b	10.02c	13.45d	<0.001
	2	5.79 ^a	6.64 ^a	9.54b	10.09b	<0.001
anteiso 17:0	1	7.32 ^a	13.24b	14.21bc	15.50c	<0.001
	2	9.90 ^a	16.18bc	14.41b	17.63c	<0.001
Relaciones C15/C17						
iso 15:0/iso 17:0	1	2.28c	0.83b	0.92b	0.48 ^a	<0.001
	2	1.82b	1.18ab	0.78 ^a	0.77 ^a	<0.001
anteiso 15:0/anteiso 17:0	1	3.98b	1.10 ^a	1.37 ^a	0.82 ^a	<0.001
	2	3.73 ^a	0.84b	1.10b	1.13b	<0.001

a-d Valores de una fila con un superíndice distinto son significativamente diferentes (P < 0.05)

de cadena de estos AG en la glándula mamaria. Sin embargo, sus efectos sobre los BCFA quedan pendientes de esclarecer.

2.2. INFLUENCIA DE LA DIETA DEL GANADO SOBRE LOS CONTENIDOS DE OBCFA

La ración consumida por los rumiantes ejerce una gran influencia sobre la síntesis microbiana de AG. La proporción de OBCFA que alcanza el intestino delgado para ser absorbida puede considerarse un reflejo de las poblaciones microbianas del tracto digestivo y del efecto que las características de la ración consumida tiene sobre ellas. La relación de forraje/concentrado (**F/C**), la proporción de almidón y fibra en la ración así como la suplementación lipídica son, entre otros, factores que contribuyen a configurar la microbiota intestinal, y por tanto el perfil de AG de los fluidos digestivos (Vlaeminck *et al.*, 2006a; Buccioni *et al.*, 2012; Enjalbert *et al.*, 2017).

2.2.1. EFECTOS DE LA DIETA BASE

Entre los componentes de la dieta, la proporción de almidón y fibra juega un papel relevante en la producción de OBCFA a través de su influencia en el ecosistema microbiano, y en particular sobre la proliferación de cepas bacterianas celulolíticas (Vlaeminck *et al.*, 2004; Cabrita *et al.*, 2009). Un aumento de almidón en las raciones limita el crecimiento de microorganismos celulolíticos, promoviendo la proliferación de bacterias amilolíticas. Como ya se expuso, las bacterias celulolíticas contienen en sus membranas predominantemente AG ramificados *iso* (Fievez *et al.* 2012) y son sensibles a valores bajos de pH ruminal que son los característicos de dietas con alto contenido de almidón (Sun *et al.* 2010). Vlaeminck *et al.* (2006a) observaron que dietas ricas en almidón disminuían los niveles de *iso* 14:0, *iso* 15:0 e *iso* 16:0 (**Tabla 0.7**). Igualmente, el empleo de ensilados de maíz, más abundantes en almidón que los de pasto decreció las concentraciones de *iso* 14:0, *iso* 15:0 e *iso* 17:0 en grasa de leche.

Estudios posteriores han confirmado la influencia que los contenidos en fibra y almidón tienen sobre el contenido en OBCFA (**Tabla 0.7**). Patel *et al.* (2013) reportaron que un aumento de fibra a través de la presencia de ensilados de pasto en las raciones mejoraba los contenidos en leche de *iso* 15:0, *iso* 17:0, 15:0 y 17:0, mientras que, en ganado caprino, la sustitución de fibra en detrimento de almidón en la dieta incrementaba la proporción de *iso* 15:0 tanto en el líquido ruminal (Li *et al.*, 2014a) como en leche (Li *et al.* 2014b). Estas respuestas se asociaron a una mayor abundancia de bacterias celulolíti-

Tabla 0.7. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados (g/100g de ácidos grasos totales) en leche de vacas alimentadas con ensilado de pasto o maíz (Shingfield *et al.*, 2005; Vlaeminck *et al.*, 2006a) y con varios niveles de ensilado de pasto en la dieta (Patel *et al.*, 2013), y en leche de cabras alimentada con distintos niveles de fibra en las raciones (Li *et al.* 2014b) y con distintas relaciones fibra/almidón en la dieta (Cívico *et al.*, 2017).

Ácido Graso	Shingfield <i>et al.</i> (2005)		Vlaeminck <i>et al.</i> (2006a)		Patel <i>et al.</i> (2013)		Li <i>et al.</i> (2014b)		Cívico <i>et al.</i> (2017)	
	Ensilado de pasto	Ensilado de maíz	Ensilado de pasto	Ensilado de maíz	Ensilado de pasto Alto	Ensilado de pasto Bajo	Rico en Fibra	Pobre en Fibra	Rico en Fibra	Rico en Almidón
iso 13:0	0.03	0.04							0.02	0.01
iso 14:0	0.08	0.06	0.09	0.05	0.08	0.07	0.14	0.13	0.07	0.03
iso 15:0	0.21	0.18	0.24	0.17	0.21	0.18	0.32	0.23	0.17	0.14
iso 16:0	0.21	0.23	0.18	0.16	0.26	0.26			0.19	0.15
iso 17:0	0.74	0.91	0.19	0.23	0.47	0.33	0.38	0.49	0.27	0.23
iso 18:0	0.03	0.01							0.05	0.04
anteiso 13:0	0.05	0.07								
anteiso 15:0	0.39	0.37	0.46	0.46	0.42	0.39	0.49	0.45	0.30	0.22
anteiso 17:0			0.46	0.55			0.89	0.76	0.29	0.26
11:0							0.20	0.22		
13:0							0.09	0.09		
15:0	1.22	0.78	0.95	1.21	1.06	0.94	1.00	0.98	0.82	0.62
17:0	0.63	0.54	0.48	0.55	0.67	0.53	0.73	0.68		

cas frente a las amilolíticas. También en cabra, Cívico *et al.* (2017) midieron niveles más elevados de *iso* 14:0, *iso* 17:0 y 15:0 en grasa láctea cuando la alimentación de los animales basada en un alto contenido en fibra y era pobre en almidón (**Tabla 0.7**).

La relación F/C en las raciones tiene una influencia importante en los contenidos de OBCFA en los productos lácteos. Vlaeminck *et al.* (2006a) recopilaron toda la información publicada en este ámbito y concluyeron que una proporción mayor de forraje en la dieta base contribuía a un aumento selectivo de algunos OBCFA en leche. Estos incrementos fueron especialmente significativos para *iso* 14:0 e *iso* 15:0. En contraste los aumentos de *anteiso* 15:0 fueron menos acusados y en algunos casos no se producían.

Vlaeminck *et al.* (2006a) atribuyeron tales resultados a los diferentes ecosistemas bacterianos inducidos por la variación en la relación F/C. Un aumento del concentrado en la dieta favorecería la proliferación de bacterias amilolíticas (*Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*) en detrimento de las celulolíticas (*Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*). La presencia preponderante de estos últimos microorganismos, como se ha expuesto en párrafos precedentes, favorecería un incremento de AG *iso*, mientras la presencia de los primeros podría aumentar los OCFA y *anteisos*. Dewhurst *et al.* (2007) por ejemplo, observaron niveles más bajos de 15:0 y 17:0 en leche de vacas alimentadas con dietas con una relación F/C alta. Esta disminución de los OCFA también fue detectada en ovino al disminuir la proporción de forraje en la dieta base (Gómez-Cortés *et al.*, 2011a) (**Tabla 0.8**).

El análisis de fluidos digestivos extraídos de cabras canuladas duodenalmente permitió constatar que el aumento de la proporción de forraje en la ración causaba un aumento de todos los OBCFA sintetizados *de novo* por las bacterias (Bas *et al.*, 2003). Un experimento similar llevado a cabo en ganado vacuno (Vlaeminck *et al.*, 2006b) arrojó resultados parecidos. Más recientemente, Zhang *et al.* (2017) confirmaron que los perfiles de OBCFA de fluidos digestivos en bovino son fuertemente afectados por la relación F/C en la dieta. Las concentraciones de 11:0, 13:0, *iso* 15:0, *iso* 16:0, *iso* 17:0 y 17:0 eran más altas cuando la proporción de forraje en la ración era más abundante. También observaron que *anteiso* 15:0 y 15:0 eran más altos con proporciones más elevadas de concentrado.

2.2.2. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN LIPÍDICA

La inclusión de fuentes de grasa en las raciones ocasiona una reducción del contenido de AG sintetizados *de novo* en las bacterias, debido a una utilización preferente de los AG preformados disponibles para la síntesis de FL y la

Tabla o.8. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados en leche de vaca (Dewhurst *et al.*, 2007; Vazirigozar *et al.*, 2018) y oveja (Gómez-Cortés *et al.*, 2011) con distintas proporciones de forraje/concentrado (F/C) en la dieta base.

Ácido graso	Dewhurst <i>et al.</i> (2007)			Gómez-Cortés <i>et al.</i> (2011)			Vazirigozar <i>et al.</i> (2018)			
	F/C	F/C	F/C	F/C	F/C	F/C	F/C	F/C	F/C	
	80/20	65/35	50/50	35/65	70/30	50/50	30/70	48/52	44/56	39/61
		g/día			g/100 g de ácidos grasos totales			g/100 g de ácidos grasos totales		
iso 13:0	0.19	0.20	0.23	0.27	0.02	0.02	0.01	0.29	0.27	0.24
iso 14:0	0.70	0.66	0.72	0.69	0.05	0.06	0.06	0.11	0.10	0.08
iso 15:0	2.09	2.09	2.03	1.95	0.15	0.12	0.09	0.19	0.18	0.15
iso 16:0	1.28	1.35	1.56	1.65	0.36	0.42	0.44	0.26	0.25	0.24
iso 17:0	1.44	1.51	1.41	1.65				0.35	0.34	0.35
iso 18:0								0.48	0.52	0.62
anteiso 13:0	0.50	0.54	0.62	0.69				0.01	0.01	0.01
anteiso 15:0	3.27	3.43	3.58	3.61	0.43	0.45	0.38	0.54	0.53	0.52
13:0					0.20	0.17	0.16			
15:0	9.88	9.38	98.78	8.72	0.92	0.87	0.80	0.98	0.96	1.03
17:0	4.45	4.35	4.01	4.18	0.51	0.49	0.45	0.49	0.49	0.53

constitución de reservas citoplasmáticas (Bauchart *et al.*, 1990). El aumento de los contenidos bacterianos de OBCFA cuando la ración no contiene grasa añadida podría explicarse porque su menor punto de fusión, en comparación con los AG saturados de igual número de átomos de carbono, ayudaría a compensar la escasez de PUFA preformados y mantener la fluidez de los lípidos necesaria para la función de las membranas celulares (Bas *et al.*, 2003).

A la hora de utilizar suplementos de origen vegetal en la alimentación de rumiantes, también es importante conocer la cantidad de PUFA que puede ser adicionada sin que aparezcan efectos adversos en la población microbiana del rumen o sobre la eficacia productiva del ganado. Los suplementos lipídicos están restringidos en bovino a niveles menores del 6% en materia seca, pero el uso de semillas o de aceites protegidos permite superar este nivel al resultar menos agresivos fisiológicamente (Bauman y Lock, 2006).

La severidad del efecto de los AG incorporados de la dieta sobre la viabilidad de las bacterias del rumen es mayor a medida que aumenta la insaturación de la molécula. Los efectos serían más acusados si la configuración geométrica del doble enlace es del tipo *cis* (Vlaeminck *et al.*, 2006a). Además, no todos los microorganismos se ven afectados de la misma forma por la suplementación lipídica de la dieta. Las bacterias celulolíticas y Gram positivas serían más sensibles que las amilolíticas y las Gram negativas (Maia *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2009; Enjalbert *et al.*, 2017).

Los niveles de OBCFA medidos en productos lácteos de animales en cuya dieta han sido incorporados suplementos lipídicos reflejan una disminución significativa. Este pauta observada en leche de vaca (Baumann *et al.*, 2016; Vazirigohar *et al.*, 2018) y otros rumiantes (Gómez-Cortés *et al.*, 2011b; Martínez Marín *et al.*, 2011) no sólo es característica de la suplementación con semillas de oleaginosas ricas en AG insaturados (**Tabla 0.9**), ya que puede extenderse también a aceites de origen marino (Toral *et al.*, 2010).

2.3. ÁCIDOS GRASOS RAMIFICADOS COMO COMPONENTES BIOACTIVOS

2.3.1. MICROBIOTA INTESTINAL

A pesar de su carácter minoritario, investigaciones desarrolladas desde comienzos de siglo han desvelado el papel que este grupo de AG puede jugar como protectores de la salud. La presencia de AG ramificados es muy escasa en los tejidos humanos de adultos, pero en los estadios finales del desarrollo

Tabla 0.9. Contenido en ácidos grasos de cadena impar y ramificados (g/100g de ácidos grasos totales) en leche de ovejas alimentadas sin suplementación lipídica (control) y con dietas suplementadas con 17, 34 y 61 g/Kg de materia seca (MS) con aceite de girasol (Gómez-Cortés *et al.* 2011) y cabras alimentadas sin suplementación lipídica y con dietas suplementadas con 48 g/día de aceite rico en ácido oleico (girasol altooleico), linoleico (girasol) y α -linolénico (lino) (Martínez Marín *et al.*, 2011).

Ácido graso	Gómez-Cortés <i>et al.</i> (2011)			Martínez Marín <i>et al.</i> (2011)				
	Control	17 g/Kg de MS Girasol	34 g/Kg de MS Girasol	61 g/Kg de MS Girasol	Control	48 /día G. altooleico	48 g/día Girasol	48 g/día Lino
iso 13:0					0.02	0.02	0.02	0.02
iso 14:0					0.05	0.04	0.05	0.04
iso 15:0	0.18	0.17	0.18	0.18	0.14	0.12	0.13	0.12
iso 16:0	0.35	0.36	0.30	0.28	0.14	0.15	0.11	0.11
iso 18:0					0.04	0.03	0.04	0.03
anteiso 13:0	0.06	0.05	0.04	0.04	0.08	0.04	0.05	0.05
anteiso 15:0	0.36	0.32	0.30	0.28	0.28	0.24	0.23	0.23
13:0	0.21	0.17	0.13	0.11				
15:0	0.93	0.78	0.70	0.65	0.91	0.72	0.69	0.67
17:0	0.64	0.54	0.47	0.43	0.39	0.35	0.33	0.33

fetal y tras el nacimiento son componentes bioactivos esenciales del tracto digestivo (Ran-Ressler *et al.* 2008).

Aproximadamente, un 30% de los AG presentes en el vérnix caseoso corresponde a los BCFA (Ran-Ressler *et al.*, 2008) con una gran variedad de estructuras moleculares entre las que destacan el *iso* 14:0 y el *iso* 16:0 (Figura 0.6). El vérnix es un material ceroso con una textura similar al queso que reviste la piel del feto y del recién nacido. Consiste en una mezcla de secreciones grasas originadas a partir de la semana dieciocho de gestación y procedentes de las glándulas sebáceas del feto. El vérnix evita la pérdida de agua, protegiendo la piel del feto de la deshidratación, impidiendo su endurecimiento y disminuyendo las rozaduras y el agrietamiento. En su ausencia, la piel se verá arrugada debido a la constante exposición a la composición acuosa del líquido amniótico. Además, el vérnix contribuye a regular la temperatura al actuar como una capa aislante. No existe otro mamífero terrestre que produzca neonatos cubiertos de vérnix, en contraste a lo que ocurre con mamíferos acuáticos (Wang *et al.*, 2018).

Una hipótesis complementaria señala el papel del vérnix como agente antibacteriano. Esta idea se basa en qué, en los últimos meses del embarazo, las partículas de vérnix se desprenden de la piel y pasan al líquido amniótico incrementando su turbidez. Puesto que durante el último trimestre en el vientre materno el feto ingiere gran cantidad de líquido amniótico, esta ingesta arrastra y deja expuesto su intestino a las partículas de vérnix presentes en él (Ran-Ressler *et al.*, 2008). De hecho, la vérnix caseosa es considerada el primer alimento sólido que toman los humanos.

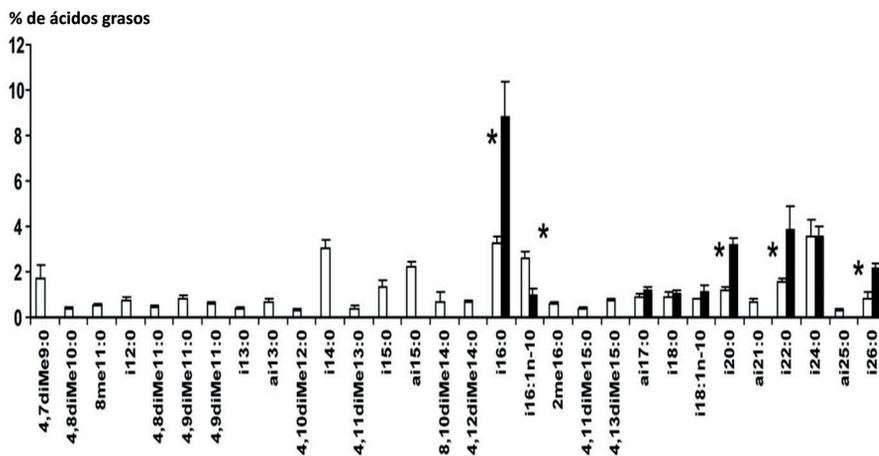


FIGURA 0.6. Perfiles de ésteres met licos de ácidos grasos de cadena ramificada encontrados en el vérnix (trama blanca) y en el meconio (trama negra). ai: anteiso; i: iso; Me: metil ramificado; diMe: dimetil ramificados; * $p < 0.05$ (adaptada de Ran-Ressler *et al.*, 2007).

La gran cantidad de AG ramificados detectados en el meconio (las primeras heces fecales del neonato) constituye un indicio suficientemente relevante (**Figura 0.6**) sobre el tipo de microorganismos que comienzan a colonizar el tracto intestinal del neonato y que se vería favorecido por la presencia de estos prebióticos no fermentables. Como se ha expuesto en párrafos precedentes, los BCFA están entre las moléculas más importantes de las membranas de muchos microorganismos, particularmente de la mayoría de las especies del género *bacilli* (Kaneda, 1977). La sustitución de grasa de la dieta por BCFA en crías de ratas neonatas favoreció la alteración de su microbioma. Estos cambios se tradujeron en aumentos de los microorganismos capaces de incorporar BCFA en sus membranas y una reducción simultánea de la incidencia de enterocolitis necrotizante (Ran-Ressler *et al.*, 2011). Esta patología es una de las mayores causas de mortalidad de neonatos prematuros. También se sabe por estudios *in vitro* que los BCFA reducen la motilidad y presumiblemente la virulencia de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (Inoue *et al.*, 2008).

La alta concentración de BCFA, como consecuencia de la presencia del vérnix en el lumen intestinal del feto, es probable que juegue además un papel importante en el crecimiento y metabolismo de los enterocitos, así como en la salud y la regulación intestinal. Trabajos recientes han reportado que los BCFA pueden ser incorporados a los FL de las membranas de los enterocitos, confiriéndoles actividad anti-inflamatoria contra la inflamación inducida por lipopolisacáridos (Yan *et al.*, 2017, 2018). Liu *et al.* (2017) postularon que esta incorporación de los BCFA en los FL contribuiría a modular las propiedades biofísicas de las membranas. Los BCFA tienen asignadas funciones biofísicas equiparables a los AG monoinsaturados con configuración *cis* pero tienen la ventaja añadida frente a ellos, de que carecen de la vulnerabilidad frente al oxígeno, intrínseca al grupo alílico característico del doble enlace (Ran-Ressler *et al.*, 2014). Los mecanismos implicados en esta propiedad están pendientes de elucidación pero parece que los BCFA podrían interferir con la capacidad de producir estructuras rígidas, compactas, poco fluidas y con elevado punto de fusión de los AG saturados no ramificados presentes en los FL de las membranas (Ran-Ressler *et al.*, 2014).

2.3.2. OTRAS PROPIEDADES BIOACTIVAS

Además de sus efectos positivos sobre la composición de la microbiota intestinal la presencia de BCFA en la dieta podría también redundar beneficiosamente en la prevención de distintas enfermedades crónicas. El primer trabajo donde se atribuye actividad anticancerígena a los BCFA data de principios de siglo. En dicho estudio, Yang *et al.* (2000) describen los efectos inhibito-

rios de *iso* 15:0 sobre la proliferación celular y la inducción de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de próstata, leucemia y adenocarcinoma. Más recientemente, Cai *et al.* (2013) dieron cuenta de que el *iso* 15:0 podría contribuir a la inhibición de linfomas humanos. Estudios desarrollados por Wong-tangtharn *et al.* (2004, 2005) encontraron que los BCFA podrían inducir apoptosis en células de cáncer de mama e inhibir el desarrollo de tumores en cultivos celulares y modelos animales.

Por otro lado, en un trabajo reciente en humanos con sobrepeso (Mika *et al.*, 2016) se apuntó por primera vez la posibilidad de que la abundancia de BCFA *iso* en suero sanguíneo se correlacionase inversamente con la presencia de TG y estuviese asociada negativamente con otros indicadores característicos de procesos inflamatorios. En todo caso, los efectos beneficiosos de este grupo de AG precisan de más investigación que contribuya a esclarecer los mecanismos que subyacen en la prevención de distintas patologías.

2.4. ÁCIDOS GRASOS DE CADENA IMPAR COMO COMPONENTES BIOACTIVOS

Distintos trabajos desarrollados durante estos últimos años han mostrado que 15:0 y 17:0, los AG impares más abundantes en productos lácteos, podrían ejercer efectos saludables en la salud humana (Jenkins *et al.*, 2015, 2017). Se ha comprobado, por ejemplo, que existe una asociación inversa entre la concentración de ambos AG en plasma sanguíneo y el riesgo de diabetes tipo 2 (Yakoob *et al.*, 2016; Pfeuffer & Jaudszus, 2016; Risérus & Marklung, 2017). Este resultado se ha observado también en poblaciones europeas sometidas a distintos regímenes alimentarios (Forouhi *et al.*, 2014). Incluso varios estudios de prospectiva sobre enfermedades cardiovasculares en humanos han comprobado que la concentración en plasma de estos AG está asociada con un riesgo más bajo de enfermedades cardiovasculares (Khaw *et al.*, 2012; Otto *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2017). Sin embargo, se precisa una investigación más detallada que contribuya a dilucidar las rutas metabólicas implicadas en estos efectos saludables.

3. ÁCIDOS GRASOS TRANS

3.1. DEFINICIÓN

No existe una definición unánime de AGT que concierna a toda la comunidad científica internacional. La *European Food Safety Authority* (**EFSA**) los define como «todos aquellos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que tengan al menos un doble enlace en configuración *trans*» (EFSA, 2004). Sin embargo, la Comisión Mixta FAO/OMS (OMS/WHO, 2004) del *Codex Alimentarius* tiene una visión más restrictiva y considera AGT solo aquellos «ácidos grasos insaturados que contienen uno o varios dobles enlaces aislados (no conjugados) en una configuración *trans*» coincidiendo con la definición que algunos países como Estados Unidos, Canadá y Dinamarca dan de estos componentes en su legislación. Esta restricción es importante puesto que las grasas lácteas son de los pocos alimentos que poseen cantidades apreciables de PUFA con dobles enlaces conjugados y el valor nutricional de los mismos puede ser relevante tal como se expondrá en detalle posteriormente.

3.2. ORIGEN DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS

Las dos principales fuentes de AGT en los alimentos son la hidrogenación industrial de grasas vegetales ricas en AG insaturados y la biohidrogenación ruminal (**BHR**) llevada a cabo en el tracto digestivo de distintas especies de rumiantes. La hidrogenación industrial se desarrolló a principios del pasado siglo y consiste en introducir gas hidrógeno en aceites vegetales ricos en AG insaturados, bajo condiciones variables de presión y temperatura y en presencia de un metal como catalizador. Mediante esta tecnología los AG insaturados de los aceites vegetales se hidrogenan parcial o totalmente para producir grasas sólidas o semisólidas, que son menos susceptibles a la oxidación. Si el producto se hidrogena a saturación se obtiene una grasa completamente saturada y de alto punto de fusión, que no presenta isómeros *cis* y *trans*. Si la hidrogenación se realiza bajo condiciones controladas (hidrogenación parcial), se obtienen una mezcla de AG saturados, monoinsaturados, y pequeñas cantidades de poliinsaturados, con isomería *cis* y *trans*. En este proceso, los dobles enlaces de los AG se transforman de la configuración *cis* a *trans* o cambian de posición dentro de la cadena hidrocarbonada. Los contenidos de AGT y de isómeros formados en la hidrogenación industrial son muy variables y dependen de

parámetros tales como del tipo de AG insaturados de partida, de la naturaleza del catalizador utilizado y de las condiciones de hidrogenación. Los AG que se forman son, principalmente, isómeros geométricos y posicionales del ácido oleico. El perfil isomérico de estos productos se atiene a una distribución gaussiana con los contenidos más elevados para las moléculas con configuración *trans*-9, *trans*-10, *trans*-11 y *trans*-12 18:1 (Figura 0.7D) siendo el ácido eláidico (*trans*-9 18:1) el más abundante.

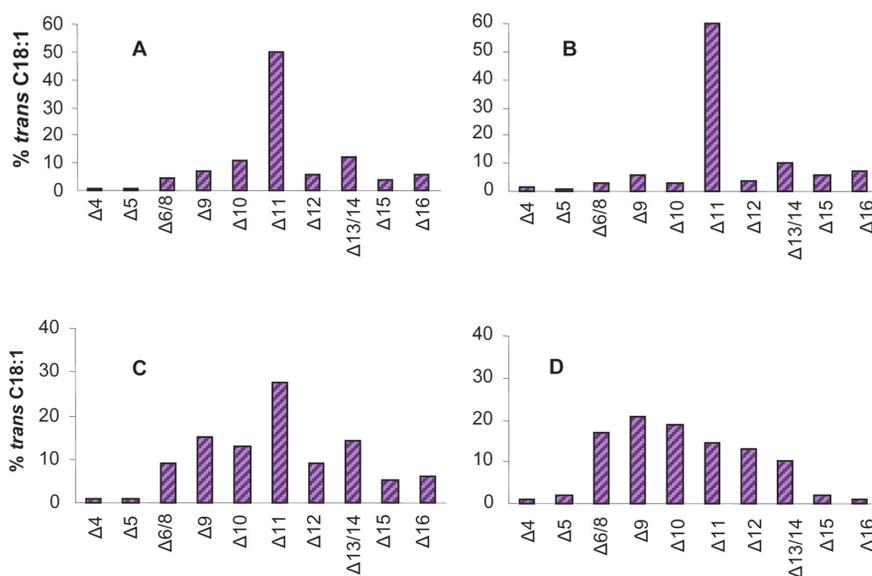


FIGURA 0.7. Distribución de los isómeros *trans* 18:1 en grasa láctea de (A) cabra, (B) vaca, (C) Mujer y (D) grasa vegetal hidrogenada. El eje de abscisas muestra la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada. Tomada de Shingfield *et al.* (2008).

La BHR se produce de forma natural en el rumen, la principal cavidad digestiva de las especies animales poligástricas. Es el resultado de la acción de enzimas de la microbiota digestiva que transforman los AG insaturados de la dieta en saturados, siendo los AGT intermediarios de estas reacciones enzimáticas. La BHR es un mecanismo de defensa de los microorganismos contra la toxicidad que para ellos representa la presencia de moléculas de PUFA. Debido a la BHR, la mayor parte de los ácidos oleico, linoleico y α -linolénico aportados por la ración se terminan transformando en ácido esteárico (18:0). Sin embargo, el proceso no es completamente eficiente y resulta en la acumulación ruminal de numerosos AG mono y poliinsaturados característicos

(isómeros *cis* y *trans* de los ácidos oleico, linoleico y α -linolénico) (Or-Rashid *et al.*, 2009; Shingfield y Wallace, 2014; Ferlay *et al.*, 2017) que se transfieren a la glándula mamaria. Su presencia en la grasa láctea se puede relacionar directamente con los AG insaturados mayoritarios en la ración consumida por los animales (Bodas *et al.*, 2012, Martínez Marín *et al.*, 2011, 2015).

Alimentos como la leche y la carne de rumiantes contienen AGT de forma natural. Entre estos, los monoinsaturados de 18 átomos de carbono son los más abundantes. El *trans*-11 18:1 también conocido como ácido vacénico (AV) es el isómero cuantitativamente más importante, constituyendo entre el 30 y el 50% de los ácidos *trans* 18:1 totales. En menor proporción están los isómeros del *trans*-9 a *trans*-16 C18:1 (**Figura 0.7A y B**).

En definitiva, los perfiles de los AGT en las grasas de las especies de animales rumiantes y en los aceites vegetales parcialmente hidrogenados son similares, con isómeros *trans* comunes, pero las proporciones pueden variar sustancialmente. La composición de AG *trans* 18:1 en la leche humana (**Figura 0.7C**) simula una mezcla de ambos perfiles, probablemente como consecuencia de la ingesta de grasas procedentes tanto de rumiantes como de alimentos que contienen ingredientes de origen industrial.

3.3. ORIGEN DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

CLA es el acrónimo que comprende un grupo de isómeros de ácido linoleico con dobles enlaces conjugados que difieren en posición y geometría (*cis* o *trans*). La fuente de CLA en la dieta humana son casi exclusivamente la carne de rumiantes y, principalmente, los productos lácteos con contenido en grasa (Van Wijlen y Colombani, 2010). Las concentraciones totales de CLA en leche provenientes de rumiantes no sometidos a regímenes especiales oscilan entre 0.3-1.0% del total de AG de los productos lácteos.

Los isómeros conjugados del ácido linoleico en las leches de rumiantes presentan posiciones de los dobles enlaces de 7-9 a 12-14 y cubren las cuatro configuraciones geométricas posibles (*cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* y *trans-trans*). El principal isómero de CLA es el ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 18:2, AR) que representa, al menos, el 75% del CLA total. Otros isómeros de CLA como el *trans*-10 *cis*-12 también están presentes de forma natural en la fracción lipídica de los productos lácteos, pero en cantidades muy bajas (**Tabla 0.10**).

Las dos vías de formación del AR en rumiantes son las que parten de los ácidos linoleico y α -linolénico de la dieta (**Figura 0.8**). Los procesos de biosíntesis implican la absorción intestinal de los compuestos intermedios producidos en el rumen por BHR de los PUFA de la ración y/o su posterior conversión a AR en la glándula mamaria. Una parte del AR se genera directamente

en el rumen por isomerización directa del ácido linoleico. Tras la absorción intestinal el AR viaja a través del torrente sanguíneo hasta la glándula mamaria donde se transfiere a los TG de la leche. Sin embargo, la mayoría del AR que finalmente termina en la grasa láctea proviene de la síntesis endógena en la glándula mamaria. Se forma por desaturación del doble enlace del carbono 11, gracias a la enzima $\Delta 9$ desaturasa utilizando como sustrato el AV generado en el rumen (**Figura 0.8**). El porcentaje endógeno de AR es de, al menos el 60% en leche de vaca (Mosley *et al.* 2006), oveja (Bichi *et al.* 2012) y cabra (Bernard *et al.* 2010).

TABLA 0.10. Contenido mínimo y máximo (% de ácidos grasos totales) de isómeros del ácido linoleico conjugado individuales en leche de vaca, oveja y cabra. Los datos han sido tomados de Ferlay *et al.* (2017)¹ y Shingfield *et al.* (2013)². NR: no reportado.

Isómero	Vaca ¹	Oveja ²	Cabra ¹
<i>cis-cis</i>			
<i>cis-9 cis-11</i>	NR	NR	0.001-0.002
<i>cis-trans</i>			
<i>cis-9 trans-11</i>	0.586-1.186	0.386-0.960	0.685-0.828
<i>cis-12 trans-14</i>	0.001-0.006	0.001-0.001	0-0.002
<i>trans-cis</i>			
<i>trans-7 cis-9</i>	0.030-0.054	0.026-0.040	0.028-0.040
<i>trans-8 cis-10</i>	NR	0.020-0.020	0.009-0.019
<i>trans-9 cis-11</i>	0.008-0.250	0.010-0.020	0.002-0.026
<i>trans-10 cis-12</i>	0.004-0.070	0.001-0.010	0.001-0.008
<i>trans-11 cis-13</i>	0.012-0.120	0.010-0.020	0.007-0.028
<i>trans-12 cis-14</i>	NR	NR	0.002-0.003
<i>trans-trans</i>			
<i>trans-7 trans-9</i>	0.002-0.007	0.008-0.009	0.003-0.007
<i>trans-8 trans-10</i>	0.002-0.004	0.010-0.011	0.002-0.004
<i>trans-9 trans-11</i>	0.009-0.012	0.009-0.011	0.013-0.021
<i>trans-10 trans-12</i>	0.003-0.008	0.005-0.006	0.003-0.003
<i>trans-11 trans-13</i>	0.015-0.160	0.010-0.030	0.003-0.009
<i>trans-12 trans-14</i>	0.007-0.017	0.010-0.010	0.002-0.009

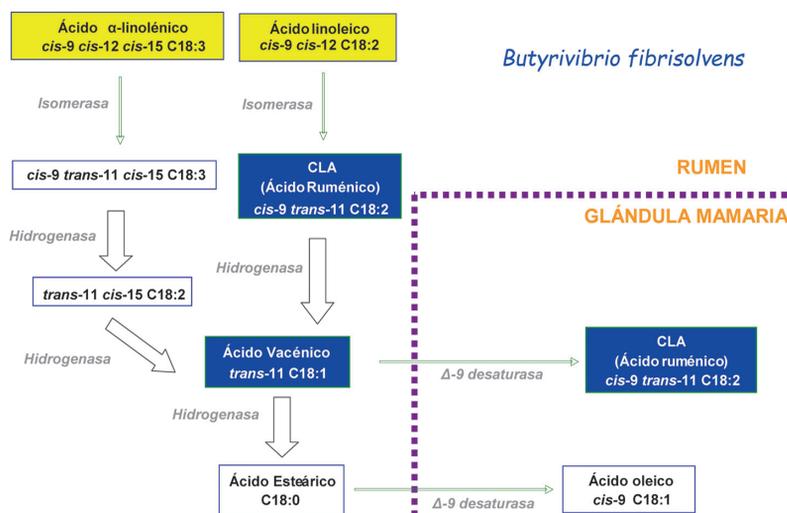


FIGURA 0.8. Rutas metabólicas de formación de *cis-9 trans-11 18:2* (ácido ruménico) en grasa láctea de rumiantes a partir de ácido linoleico y ácido α-linolénico.

3.4. INFLUENCIA DE LA DIETA DEL GANADO SOBRE AGT Y CLA

El rumen es la cavidad digestiva más importante de los rumiantes, donde se generan las modificaciones más relevantes de los AG de la dieta. Los lípidos entran en el rumen esterificados bien como TG, glicolípidos o PL. Allí son severamente alterados por la microbiota mediante dos procesos. El primero, la lipólisis, libera los AG y el segundo, la BHR, como se mencionó anteriormente, los transforma en moléculas más saturadas. Bajo condiciones normales, la lipólisis es casi completa poco después de la ingesta, mientras, en contraste, la BHR se ve notablemente afectada por el tipo de alimentación.

La modificación de la dieta basal del ganado y, sobretodo, la suplementación lipídica de la misma, son las vías que inciden de forma más pronunciada sobre el perfil de AG de los fluidos digestivos y de la leche, particularmente los *trans*, y han sido objeto de gran número de estudios y revisiones (Bauman *et al.*, 2006; Aldai *et al.* 2013; Ferlay *et al.*, 2017). Independientemente de su origen, todos los AG insaturados de la ración son susceptibles de ser biohidrogenados. Las rutas de BHR del ácido linoleico y del α-linolénico, los dos PUFA mas importantes presentes en la alimentación de rumiantes, se muestran en las **Figuras 0.9 y 0.10**. Junto a la rutas principales, con intermediarios bien estudiados y reconocidos, se dibujan también potenciales vías alternativas que darían lugar a un variado espectro de moléculas con isomería *trans*. Una parte

isómeros no suele superar el 1% del total de AG. El isómero *trans*-11 *cis*-15 18:2 es el más abundante en dietas basadas en pasto o ensilados de hierba (Bernard *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2009; Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011), mientras *cis*-9 *trans*-13 18:2 es el más característico de raciones ricas en ensilados de maíz o con alta proporción de concentrado (Bernard *et al.*, 2009; Hristov *et al.*, 2011).

3.4.2. SUPLEMENTACIÓN LIPÍDICA DE LA DIETA

Aunque la dieta base puede jugar un papel importante sobre el perfil de AGT de la leche el efecto de la adición de fuentes de grasa a la ración de las hembras rumiantes es cuantitativamente mucho más importante y ha sido objeto de distintas revisiones en profundidad (Aldai *et al.*, 2013; Shingfield *et al.*, 2013; Ferlay *et al.*, 2017). De acuerdo con Martínez Marín *et al.* (2013a), la inclusión de semillas o aceites en la ración modifica extensamente el perfil de AG de la grasa láctea y los cambios ocurren en el mismo sentido en vacas, ovejas y cabras. Algunos de los efectos observados son comunes a todos los aceites y semillas con independencia del ácido graso mayoritario que aportan a la ración (oleico, linoleico o α -linolénico): no suelen afectar negativamente al contenido de ácido butírico, reducen el de AG saturados de cadena media, y aumentan el de AG insaturados entre ellos los *trans*.

La incorporación a la dieta del ganado de distintos tipos de aceites redundan en una mejora de los contenidos totales de *trans* 18:1 en alimentos derivados de rumiantes. Los suplementos ricos en ácido oleico (oliva), linoleico (girasol, soja) y α -linolénico (lino) además alteran la distribución de isómeros *trans* 18:1 resultando en un enriquecimiento específico de los isómeros *trans* 6-8, *trans* 10-12, y *trans* 11-16, respectivamente (Chilliard *et al.*, 2007; Shingfield *et al.*, 2008). Los aumentos de *trans* 18:1 en respuesta a aceite de pescado o algas suelen estar asociados con niveles más elevados de *trans*-6 a *trans*-15 18:1 y disminuciones de *trans*-16 18:1 y en dietas bajas en forraje o con una proporción elevada de concentrados, el *trans*-10 18:1 suele reemplazar al AV como isómero predominante (Shingfield *et al.*, 2013).

Colectivamente, la suplementación de la dieta del ganado con aceites de semilla puede modificar al alza también el contenido en AG *trans* 18:2 no conjugados hasta alcanzar un 2-3% de AG totales (Bernard *et al.*, 2009). Estos AG se originan en el rumen a partir de PUFA de 18 carbonos de la dieta, pero también hay evidencias que apuntan que el *cis*-9, *trans*-12 18:2 y el *cis*-9, *trans*-13 18:2 pueden sintetizarse endógenamente (Shingfield *et al.*, 2008).

La combinación de aceites vegetales ricos en PUFA con otros de origen marino (algas o pescado), es uno de los medios más efectivos y seguros para

incrementar el AR en leche. Sin embargo, hay una considerable variación en la respuesta debido a factores como la composición de la dieta basal, la proporción de cada aceite en la ración e incluso la raza del animal (Shingfield *et al.*, 2013).

La distribución de isómeros de CLA en leche de rumiantes indica que la incorporación a la ración de una fuente de ácido oleico aumenta además la concentración de *trans-7 cis-9* CLA, la de una fuente de ácido linoleico resulta en niveles más altos de isómeros *trans-8 cis-10*, *trans-10 cis-12*, *trans-9*, *trans-11* and *trans-10*, *trans-12* mientras el ácido α -linolénico conduce a un enriquecimiento en *cis-11 trans-13*, *cis-12 trans-14*, *trans-11 cis-13*, *trans-11 trans-13* y *trans-12 trans-14* CLA (Chilliard *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007; Shingfield *et al.*, 2008).

La leche de rumiantes también posee cantidades traza de diferentes isómeros de ácido linolénico conjugado (Destailats *et al.*, 2005; Plourde *et al.*, 2007; Gómez-Cortés *et al.*, 2009b). Las concentraciones de *cis-9 trans-11 cis-15* 18:3 y *cis-9 trans-11 trans-15* 18:3 en leche son muy bajas en dietas convencionales (6 a 30 y 10 a 14 mg/100 g de AG totales respectivamente), pero su contenido se multiplica por siete en dietas con presencia relevante de ácido α -linolénico (Gómez-Cortés *et al.*, 2009b; Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011; Hristov *et al.*, 2011).

La forma de incorporación de los sustratos lipídicos puede también influir en los niveles de AG *trans* y CLA que son incorporados a la grasa láctea. Distintos trabajos han apuntado que las semillas procesadas (en forma extrusionada, micronizada, molida, calentada, etc.) generan mayores aumentos en los contenidos de CLA en leche que aquellas que se ofrecen intactas, probablemente porque los TG son más accesibles a los microorganismos responsables de la BHR (Chilliard *et al.*, 2009; Doreau *et al.*, 2009; Ferlay *et al.*, 2017). De la misma forma se ha comprobado que el aceite en forma libre es siempre más efectivo que la adición de semillas, por la mayor disponibilidad de los AG a la microflora de la cavidad ruminal (Lock y Bauman, 2004).

En general se puede afirmar que los AG mayoritarios de los aceites de semillas oleaginosas (oleico en oliva, linoleico en girasol y α -linolénico en lino) que se emplean en la suplementación de la dieta del ganado son los principales responsables de las modificaciones en el perfil isomérico de los AG de 18 átomos de carbono de la grasa de leche. Sin embargo, algunos de los cambios observados podrían ser inducidos o influenciados por otros AG minoritarios también presentes en estos aceites vegetales. Martínez Marín *et al.* (2015) aplicaron un análisis de factor principal a leches de cabra cuyas raciones habían sido suplementadas con distintas fuentes lipídicas vegetales y observaron que, si bien ciertos AG *trans* son exclusivos de la presencia en la dieta de un solo tipo de aceite, otros muchos isómeros podían tener un origen múltiple.

3.5. ÁCIDOS GRASOS TRANS Y SALUD. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS

3.5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Desde que Mensink y Katan (1990) reportaron por primera vez que la ingesta de AGT favorece el incremento de las lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) y disminuye la de alta densidad (colesterol HDL) en plasma humano, se han realizado multitud de estudios (European Commission, 2015) dirigidos a evaluar la incidencia de estos AG en las enfermedades cardiovasculares (ECV). El problema de los AGT se atribuye generalmente a su capacidad para distorsionar las membranas celulares afectando a la fluidez natural de las mismas. La interferencia de los AGT entre las moléculas de fosfolípidos, constituyentes lipídicos mayoritarios de las membranas, afectaría negativamente la estructura física de las mismas. Este hecho tiene amplias implicaciones metabólicas y puede incidir en el desarrollo de distintas patologías.

Se ha estudiado la relación entre el consumo de AGT y el riesgo de patologías cardiovasculares. La EFSA en 2004 (EFS, 2004) concluyó que existe una alta correlación entre ambos. Mozaffarian *et al.* (2006) observaron que una ingesta diaria de AGT superior al 2% de la energía total de la dieta incrementa significativamente la incidencia de ECV y que el aumento de este riesgo es directamente proporcional a la cantidad de AGT ingerida en un amplio intervalo de ingesta, desde 1,3 a 16,1 g/día.

La Organización Mundial de la Salud recomienda consumir no más del 1% de AGT sobre la ingesta diaria total de energía (OMS/WHO, 2010), mientras que la Unión Europea informa que la ingesta debería ser tan baja como sea posible (European Commission, 2015). En cualquier caso, es importante especificar el origen de los AGT, ya que los efectos podrían depender del contenido en los distintos isómeros que, como se ha indicado anteriormente, varían con cada tipo de grasa. La fuente principal de AGT en la dieta humana son las grasas vegetales parcialmente hidrogenadas, aunque también están presentes en la grasa de los rumiantes (Brouwer *et al.*, 2013).

El contenido medio de AGT en productos lácteos es bajo y su aporte, frente al conjunto de la ingesta total de energía, se encuentra en torno al 1% (Wanders *et al.* 2017). Hay una serie de trabajos que apuntan que el consumo de cantidades moderadas de AGT procedentes de la grasa de leche, no contribuiría a aumentar los riesgos cardiovasculares por la ingesta de productos lácteos, quedando confinados los efectos desfavorables sobre los factores de riesgo de ECV a los AGT de origen industrial (Gayet-Boyer *et al.*, 2014; Nestel, 2014).

Se ha argumentado que el bajo impacto negativo de los AGT de origen lácteo en la salud sería una consecuencia de la ingesta limitada de este tipo de grasa en la dieta. Un ensayo clínico documentó que niveles muy altos de AV (10 veces más que la cantidad que se consume normalmente) tuvieron efectos similares sobre los factores de riesgo de ECV, a los que producían los AGT de origen industrial (Gebauer *et al.*, 2015). Motard-Belanger *et al.*, (2008) también observaron que, si bien una ingesta elevada de AGT de cualquier fuente afectaba adversamente a los niveles de colesterol LDL y HDL del plasma, el consumo de AGT de rumiantes en cantidades moderadas, pero que excedían la ingesta normal, tenía un efecto neutro sobre el riesgo de ECV. Además, la mayoría de los estudios declaran que la asociación positiva entre el consumo de AGT y el riesgo de ECV podría explicarse completamente por la ingesta de AGT de origen industrial y, al menos, no se informaron cambios al aumentar los AGT de fuentes de rumiantes (Jakobsen *et al.*, 2008; Gebauer *et al.* 2011; Bendtsen *et al.*, 2011). Una revisión más reciente relacionada con los AGT de rumiantes deja claro que no se les puede atribuir ningún efecto fisiológico adverso convincente y que solo un consumo extremadamente alto de AGT de origen natural causaría efectos negativos sobre los lípidos del plasma (Kuhnt *et al.* 2016).

3.5.2. EFECTOS ESPECÍFICOS DE ISÓMEROS INDIVIDUALES

Las conclusiones de los estudios anteriormente mencionados están basadas en el supuesto de la existencia de dos grupos homogéneos diferenciados de AGT. Sin embargo, durante mucho tiempo, los efectos en la salud de AGT han ignorado el papel de los isómeros individuales, probablemente debido a su falta de disponibilidad comercial. Vahmani *et al.* (2015a,b) describieron, en adipocitos de ratón, que los isómeros *trans*-18:1 se metabolizan de manera diferente y tienen diferentes propiedades lipogénicas, en las que la posición del doble enlace desempeñaría un papel esencial. El AV y el isómero *trans*-13, por ejemplo, mostraron la mayor actividad de la enzima $\Delta 9$ desaturasa mientras *trans*-9 favorecía la expresión de distintos genes lipogénicos. Los efectos de los isómeros *trans*-18:1 individuales también se compararon en las células hepáticas. *Trans*-6, *trans*-9 y *trans*-10-18:1 inducían la expresión de genes implicados en aumentos de TG y ésteres de colesterol, en contraste a otros isómeros como el AV (Vahmani *et al.*, 2017).

Field *et al.*, (2009) revisaron la información publicada sobre los efectos del AV en líneas celulares, modelos animales y humanos. Concluyeron que los estudios epidemiológicos, clínicos y de roedores hasta esa fecha, no avalaban una relación entre AV y ECV, resistencia a la insulina o generación de proce-

Los inflamatorios. Desde entonces, una serie de efectos positivos para la salud se han atribuido específicamente al AV. Un estudio de seguridad oral aguda en ratas alimentadas con una grasa láctea fuertemente enriquecida en AV disminuyó significativamente el contenido de TG en plasma sanguíneo sin generar efectos metabólicos perjudiciales ni influir negativamente en los parámetros toxicológicos (Anadón *et al.*, 2010). Otros trabajos más recientes con modelos animales han acumulado nuevas evidencias sobre las ventajas metabólicas de la presencia de AV en la dieta (Wang *et al.*, 2012; Jacome-Sosa *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

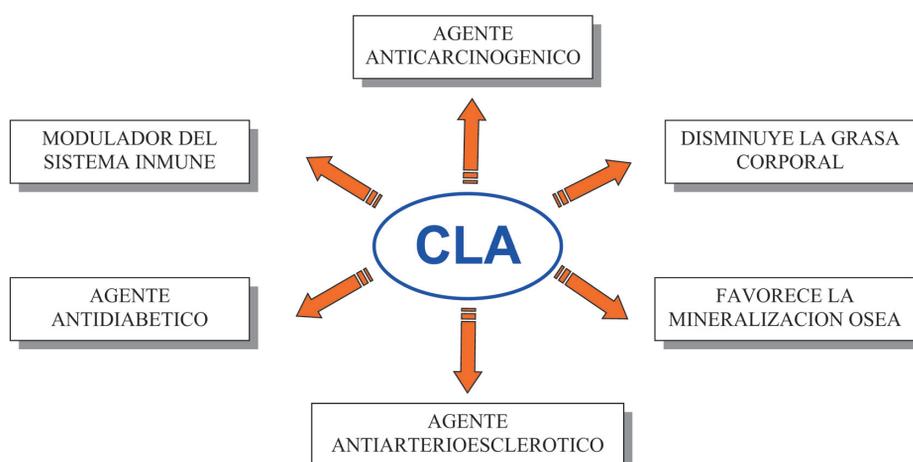


FIGURA 0.11. Efectos beneficiosos del ácido linoleico conjugado (CLA) observados en experimentos in vitro y con modelos animales. Tomada de De la Fuente y Juárez (2004).

Aparentemente, la importancia del AV radica en su papel como precursor de AR, uno de los compuestos bioactivos más relevantes presentes en la grasa de la leche (ver la siguiente sección). Inicialmente, se creía que la síntesis endógena de AR solo se producía en la glándula mamaria de rumiantes, pero como se ha indicado se ha demostrado que este isómero de *trans* 18:1 también se sintetiza a través de la $\Delta 9$ desaturasa presente en tejidos humanos (Van Wijlen y Colombani, 2010). Además, hay evidencias crecientes que sugieren que la bioactividad del AV es independiente de su papel como promotor o sustrato enzimático para la formación de AR. Por ejemplo, se ha documentado que el AV suprime la proliferación de células MCF-7, lo que indicaría que este isómero ejercería un efecto anticancerígeno directo sobre el adenocarcinoma

humano (Lim *et al.*, 2014). Herrera-Meza *et al.* (2013) también reportaron efectos beneficiosos sobre los biomarcadores de riesgo de ECV en ratas hipertensas alimentadas con una dieta que incluía grasa de leche enriquecida naturalmente en AV y AR, incluso cuando se administró un inhibidor de la $\Delta 9$ desaturasa. Otros trabajos en modelos animales han revelado también las propiedades como agente antiinflamatorio en el metabolismo lipídico que podría desempeñar este isómero 18:1 al margen de su papel como sustrato para la síntesis de AR (Jaudszus *et al.*, 2012; Jacome-Sosa *et al.*, 2016).

Los isómeros *trans* monoinsaturados distintos de 18:1 también se pueden encontrar en la grasa de la leche en pequeñas cantidades (Jensen, 2002), pero sus efectos en la salud humana son muy poco conocidos. Solo el *trans*-9 16:1, un biomarcador natural de grasa de leche, ha merecido cierta atención. La presencia de este isómero en humanos se ha asociado negativamente con la incidencia de diabetes (Mozaffarian *et al.*, 2010, 2013), la mortalidad relacionada con la ECV y la muerte súbita cardíaca (Kleber *et al.*, 2016). Estas evidencias indican el interés de más investigación sobre el mismo en el futuro.

3.6. EL ÁCIDO RUMÉNICO COMO COMPONENTE BIOACTIVO DE LA LECHE

Desde la identificación del CLA como un compuesto capaz de inhibir la carcinogénesis (Ha *et al.*, 1987), la investigación sobre este AG ha experimentado un crecimiento exponencial. Hay más de 5.000 publicaciones relacionadas con CLA solo en los últimos diez años (*Web of Science*, octubre de 2018), que reflejan el interés científico en estas moléculas. Los efectos potencialmente beneficiosos atribuidos al CLA en la literatura científica son muy numerosos (**Figura 0.11**). Entre ellos cabe destacar su papel como agente antitumoral (Kelley *et al.*, 2007; Jun, 2016; Shokryzadan *et al.*, 2017) y antiarterioesclerótico (Dilzer y Park, 2012; Kim *et al.*, 2016; Bruen *et al.*, 2017). La mayoría de estas propiedades bioactivas se han relacionado con dos isómeros, el *trans*-10 *cis*-12 y el AR. Como ya se expuso previamente el primero es muy escaso en leche mientras el segundo es abundante en dicho alimento.

Los distintos efectos bioactivos observados para el AR y el *trans*-10 *cis*-12 18:2 pueden ser atribuidos a las diferencias estructurales entre las dos moléculas que son derivadas de la posición y la geometría de los dos dobles enlaces (**Figura 0.12**). *Trans*-10 *cis*-12 18: 2 se oxida más eficientemente que el AR (Churruca *et al.*, 2009) porque sus dobles enlaces están más expuestos y, como resultado, su papel se relaciona con procesos catabólicos como la lipólisis o la oxidación de grasas. En contraste, el AR se ha asociado mayoritariamente a

efectos anabólicos y antiinflamatorios (Reynolds y Roche, 2010; Ferlay *et al.*, 2017; Lordan y Zabetakis, 2017).

Los procesos inflamatorios celulares subyacen en la patogenia de las ECV, la diabetes, las infecciones virales o el cáncer y el AR ha demostrado un gran número de efectos positivos contra la respuesta inflamatoria en distintos modelos *in vitro* y animales (Viladomiu *et al.*, 2016). Esta actividad antiinflamatoria estaría vinculada a dos vías metabólicas que concurren en las células, la plasmática y la nuclear.

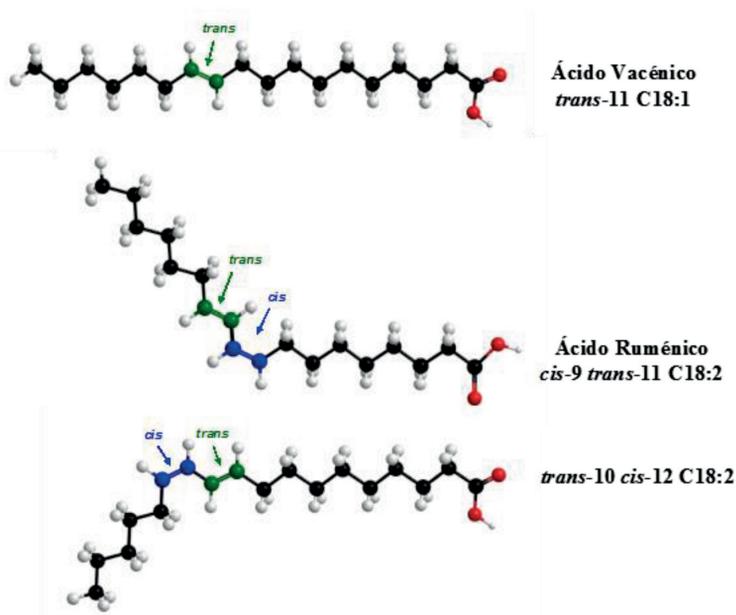


FIGURA 0.12. Estructura química del *trans*-11 18:1, *cis*-9 *trans*-11 18:2 y del *trans*-10 *cis*-12 18:2. Tomada de Gómez-Cortés y De la Fuente y Juárez (2010).

En la vía plasmática el AR intervendría disminuyendo la síntesis de eicosanoides (citoquinas, tromboxanos, prostaglandinas) pro-inflamatorios que se originan a partir del metabolismo del ácido araquidónico (20:4 n-6) y su precursor celular, el ácido linoleico. Como se muestra en la **Figura 0.13**, el AR competiría con estos AG por las mismas rutas enzimáticas. En primer término, el AR dificultaría la síntesis de 20:4 n-6 a partir de linoleico. Por otro lado, el AR contribuiría a disminuir la formación de eicosanoides proinflamatorios generados a partir de 20:4 n-6, compitiendo por las mismas ciclooxigenasas y lipoxigenasas. Globalmente la producción de eicosanoides conjugados esta-

ría relacionada con la prevención de procesos de inflamación, vascularización, promoción de tumores y respuesta inmune (Bellury, 2002, Yang *et al.*, 2015).

En la vía nuclear el AR operaría como un ligando de alta afinidad de los denominados Receptores Activados por Proliferadores Peroxisómicos (PPAR en sus siglas en inglés). Aquellos PPAR activados por el AR (**Figura 0.13**) actuarían como reguladores negativos de genes diana implicados en la modulación de la inflamación, carcinogénesis, adiposidad, diabetes y generación de enfermedades cardiovasculares (Bellury *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015; Viladomiu *et al.*, 2016).

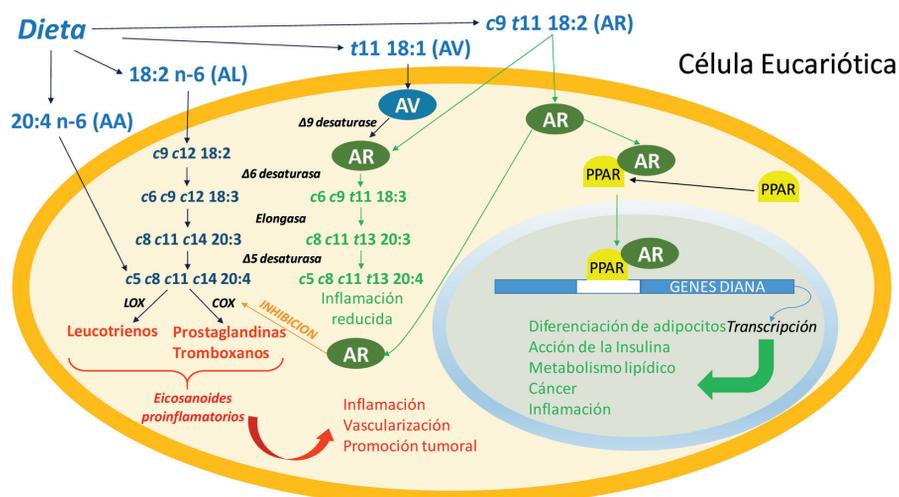


FIGURA 0.13. Mecanismos de acción del *cis*-9 *trans*-11 18:2 (ácido ruménico, AR) en el metabolismo celular. AA: ácido araquidónico (20:4 n-6); COX: cicloxigenasa; AL: ácido linoleico (18:2 n-6); LOX: lipoxigenasa; PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisómicos; AV: ácido vacénico (*trans*-11 18:1). Tomada de Gómez-Cortés *et al.* (2018).

En comparación con los resultados observados en modelos animales, los efectos de la ingesta de CLA en ensayos en humanos son más limitados. Una posible explicación es que en animales los ensayos se han realizado con concentraciones más altas y la dosis en la dieta es un factor importante a considerar. Hasta la fecha, no hay muchos estudios de intervención en la dieta humana que evalúen el consumo de productos lácteos enriquecidos en AR. Tricon *et al.* (2006) no detectaron modificaciones significativas en los biomarcadores inflamatorios después del consumo de diferentes productos lácteos enriquecidos en AR (1,40 g/día), mientras Sofi *et al.* (2010) observaron una reducción

significativa de las citoquinas inflamatorias tras la ingesta de queso de leche de oveja enriquecido en AR (0,14 g/día). Penedo *et al.* (2013) midieron también disminuciones de interleuquinas pro-inflamatorias en adultos tras el consumo de mantequillas enriquecidas en AR (1,00 g/día). Jaudszus *et al.* (2016) observaron en un ensayo piloto que la suplementación dietética con AR purificado disminuía moderadamente la respuesta inflamatoria a nivel celular en niños con asma. Aunque esta información se extrae de un número limitado de estudios, son evidencias prometedoras que sugieren que el consumo de AR sería útil para reducir las respuestas inflamatorias y prevenir enfermedades relacionadas posteriores.

4. LA LECHE DE CABRA

La cabra ha sido considerada en el pasado como la “vaca del pobre”. Sin embargo, la cabra y los productos lácteos de cabra comenzaron a ganar importancia en Estados Unidos en la década de 1960 debido al interés por la salud, por su fácil digestibilidad y menores propiedades alergénicas en comparación con la leche de vaca, hasta el punto que en determinados sectores ha sido considerada como un nutraceutico (Clark y Mora García 2017).

La leche de cabra ocupa el cuarto lugar después de la de vaca, búfala y oveja en términos de producción mundial de leche. No obstante, la producción de leche de cabra es probable que sea mucho mayor que la recogida en las estadísticas oficiales porque una gran cantidad de leche se utiliza para el consumo doméstico. Sin embargo, su producción tiene un importante impacto económico en países donde las condiciones climáticas no son favorables para la ganadería bovina.

La producción de leche en España sigue una tendencia creciente. La mayoría de la leche producida en España como materia prima es de origen vacuno: las entregas de leche de vaca, oveja y cabra realizadas en 2017, superan las 8 millones de toneladas al año, un 87,6 % corresponden a leche de vaca, 6,4 % a leche de oveja y 6% a leche de cabra (**Figura 0.14**). En el contexto de la UE, la producción española de leche de vaca se sitúa en torno al 5% del total comunitario, frente al 15% y 20% que representan la leche de oveja y de cabra, respectivamente. Actualmente, España es el país de la UE que más leche de cabra exporta, situándose en segunda posición en términos de producción. A nivel mundial la producción de leche de vaca en 2017, alcanzó 811 millones de toneladas (FAO, 2018).

La composición de la leche puede variar independientemente de la especie entre límites amplios por un conjunto de factores que se pueden considerar en dos grandes grupos, propios del animal y ligados a las condiciones de la producción. En el primer grupo figuran fundamentalmente factores genéticos como la raza y factores fisiológicos como el estado de lactación y el estado sanitario (mamitis). En el segundo grupo encontramos la alimentación, estación, clima y tipo de ordeño (Park et al, 2007).

La **tabla 0.11** recoge la composición media e intervalos de variación de los principales componentes de la leche de cabra. La composición de la leche de cabra es similar a la de la leche de vaca en términos de sólidos totales, contenido de grasa, proteínas, lactosa cenizas y densidad. Sin embargo, la leche de cabra tiene mayor viscosidad y acidez pero menor índice de refracción y punto de congelación que la leche de vaca (Amigo y Fontecha, 2011).

TABLA 0.11. Composición media e intervalos de variación de sólidos totales, grasa, proteína, caseína, lactosa y cenizas de leche de cabra (Porcentaje en peso). Los datos han sido tomados de Amigo y Fontecha (2011).

	Valor Medio	Intervalo de variación
Sólidos Totales	12,90	9,95–21,5
Grasa	4,10	2,9 – 5,06
Proteína	3,50	2,33–4,63
Caseína	2,90	
Lactosa	4,50	3,62–6,30
Cenizas	0,80	0,60–0,89

Como ya se ha comentado la fracción grasa es uno de los componentes más importantes de la leche. En cabra la composición de AG muestra diferencias sustanciales con la de la leche de vaca (Tabla 3). Es más rica (2-3 veces) en AG de cadena corta y media como caproico (6: 0), caprílico (8: 0), cáprico (10: 0) y láurico (12: 0), así como de BCFA con menos de 11 átomos de carbono (Tabla 5), que son prácticamente inexistentes en la leche de vaca y que son importantes para el sabor de los productos a base de leche de cabra (Alonso *et al.*, 1999).

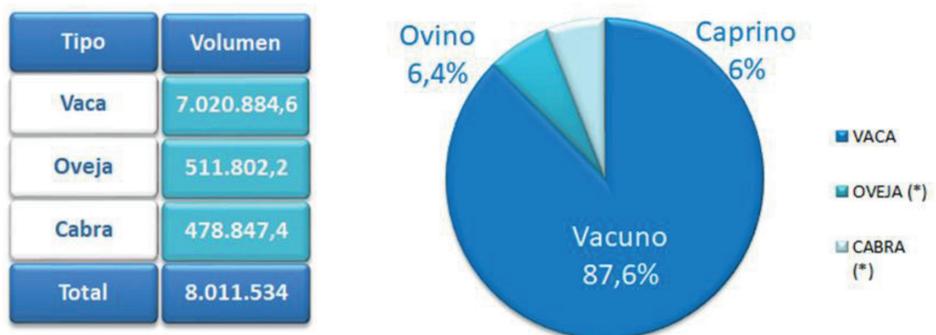


FIGURA 0.14. Entregas de leche en España durante el año 2017 (millones de Tm) y distribución entre especies de rumiantes. Fuente: Federación Española de Industrias Lácteas (FENIL, 2017).

Objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis es establecer las relaciones de los isómeros de la biohidrogenación ruminal con los ácidos grasos impares y ramificados de los lípidos bacterianos en la grasa láctea para interpretar el impacto de la dieta suministrada al rumiante sobre las poblaciones microbianas del rumen y su repercusión en los atributos nutritivos de la grasa de la leche y sus productos derivados. Con este propósito se han propuesto tres objetivos específicos en los tres capítulos experimentales que componen esta tesis:

- Esclarecer las relaciones entre los ácidos grasos de la leche derivados del metabolismo lipídico de las bacterias del rumen —ácidos grasos impares y ramificados e intermediarios de la biohidrogenación ruminal—.
- Estudiar los cambios en los contenidos de algunos ácidos grasos e índices de la grasa láctea, relevantes desde el punto de vista de la salud humana, tras la inclusión de aceite vegetales con diferente grado de insaturación en la dieta.
- Uso de técnicas estadísticas avanzadas para determinar la utilidad de los ácidos grasos de la leche derivados del metabolismo lipídico microbiano como predictores de la composición de la dieta consumida por los animales.



Capítulo 1

RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE LA LECHE DE CABRA DERIVADOS DEL ME-
TABOLISMO MICROBIANO RUMINAL



RESUMEN

Los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal son componentes únicos de la grasa láctea de los rumiantes que derivan del metabolismo lipídico de las bacterias del rumen. El objetivo del presente trabajo fue contribuir a esclarecer las relaciones entre los ácidos grasos de ambos grupos en la grasa láctea de cabras. Para ello, se utilizaron los datos de composición de la grasa láctea de 112 muestras individuales obtenidas en una serie de cinco experimentos que investigaron los cambios de los ácidos grasos de la leche en respuesta a la inclusión de aceites vegetales en la dieta de cabras. En todos los experimentos, las condiciones de manejo y la ración basal suministrada a los animales fue similar, con excepción del aceite añadido. Se obtuvieron numerosas correlaciones significativas. Los cambios opuestos simultáneos en los contenidos de algunos ácidos grasos de ambos grupos permitieron identificar a determinadas especies bacterianas del rumen por su doble papel en la degradación de los carbohidratos y en la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos de la dieta. En este sentido, se observó que las condiciones que favorecieron la acumulación relativa de isómeros monoinsaturados respecto a su producción a partir de los C18:2, lo que puede interpretarse como un efecto negativo sobre las bacterias del grupo B de la biohidrogenación, también redujeron la llegada a intestino de C13:0 anteiso pero aumentaron la de C15:0 anteiso, lo que indica un efecto negativo sobre las bacterias celulolíticas. Igualmente, las relaciones negativas observadas reflejaron cambios en la actividad enzimática de la glándula mamaria, de forma que las mismas condiciones que favorecieron la producción ruminal de isómeros tuvieron un efecto negativo en la síntesis *de novo* y la Δ -9 desaturación de C17:0. En conjunto, los resultados obtenidos indican que las relaciones entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea pueden utilizarse como un indicador no invasivo de los efectos de la dieta suministrada a los animales sobre las bacterias del rumen y la actividad de las enzimas de la glándula mamaria.

Palabras clave: leche, grasa, ácidos grasos, rumen, cabras.



INTRODUCCIÓN

El metabolismo lipídico de los rumiantes es muy distinto al de los monogástricos en diferentes aspectos que en última instancia están relacionados con las modificaciones que los microorganismos ruminales realizan en los nutrientes de la dieta, incluyendo los lípidos y los sustratos lipogénicos (Buccioni *et al.*, 2012). Las bacterias ruminales son las principales responsables de la biohidrogenación ruminal, proceso mediante el que los ácidos grasos insaturados de la dieta (ácidos oleico –C18:1 *cis*-9-, linoleico –C18:2 *cis*-9,*cis*12- y α -linolénico –C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-) se convierten en ácido esteárico (C18:0) por hidrogenación de los dobles enlaces (Or-Rashid *et al.*, 2009). Las rutas bioquímicas de la biohidrogenación son específicas para cada uno de los ácidos grasos insaturados, aunque comparten a C18:1 *trans*-11 como principal producto previo a la producción de C18:0 (Shingfield y Wallace, 2014). El proceso de biohidrogenación no es completamente eficiente y resulta en la producción de numerosos ácidos grasos mono y poliinsaturados (isómeros geométricos y posicionales, *cis* y *trans*, de los ácidos oleico, linoleico y α -linolénico) en los diferentes pasos de cada una de las vías (Harfoot y Hazlewood, 1997). La presencia de estos ácidos grasos en la grasa láctea se relaciona directamente con los ácidos grasos insaturados mayoritarios en la dieta consumida por los animales (Bodas *et al.*, 2010, Martínez Marín *et al.*, 2015).

Los microorganismos ruminales también sintetizan ácidos grasos de cadena media y larga, principalmente de cadena ramificada (iso y anteiso) y con un número impar de carbonos, a partir de ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación de los carbohidratos y los aminoácidos de los alimentos consumidos (Fievez *et al.*, 2012). Los ácidos grasos impares de cadena lineal (ej. C13:0, C15:0, C17:0) son sintetizados *de novo*, utilizando ácido propiónico como sustrato. C15:0 y C17:0 también pueden originarse por la α -oxidación bacteriana de C16:0 y C18:0, respectivamente. Los ácidos grasos ramificados iso de cadena par se sintetizan a partir del ácido isobutírico, mientras que los iso y anteiso de cadena impar se producen cuando los sustratos utilizados son los ácidos isovalérico y 2-metil-butírico, respectivamente (Vlaeminck *et al.*,

2006a). El bajo punto de fusión de los ácidos grasos impares y ramificados hace que sean incorporados preferentemente en las membranas celulares microbianas para contribuir al mantenimiento de su fluidez (Rashid *et al.*, 2007) y la proporción de cada uno de ellos en los lípidos microbianos que llegan al intestino delgado puede considerarse un reflejo de las poblaciones microbianas del rumen (Vlaeminck *et al.*, 2006a).

Tras su absorción en intestino delgado, la mayoría de los ácidos grasos procedentes del metabolismo microbiano ruminal se incorporan a la grasa láctea sin modificaciones, pero puede ocurrir Δ -9 desaturación de ácidos grasos impares de cadena lineal y elongación de los ácidos grasos impares lineales y ramificados (Fievez *et al.*, 2012; Vlaeminck *et al.*, 2015), así como Δ -9 desaturación de ácidos grasos *trans* monoinsaturados, especialmente C18:1 *trans*-11 (Grinari *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2010; Bichi *et al.*, 2012).

Ambos grupos de ácidos grasos, cuyo aporte a la dieta humana depende casi exclusivamente de la grasa láctea, ha despertado gran interés en los últimos años porque numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y con modelos animales señalan que algunos de ellos pueden tener efectos potencialmente beneficiosos sobre la salud humana (Shingfield *et al.*, 2008). Por ejemplo, los ácidos grasos iso y anteiso tienen la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de varias líneas de células tumorales, incluyendo las de cáncer de mama. Al ácido vacénico (C18:1 *trans*-11), además de ser precursor del ácido ruménico (C18:2 *cis*-9,*trans*-11), se le reconocen efectos positivos sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular (Field *et al.*, 2009). El ácido ruménico y otros isómeros del ácido linoleico conjugado tienen una variada actividad fisiológica, incluyendo regulación de la acumulación de grasa corporal, protección frente a aterosclerosis y efectos anticarcinogénicos (Parodi, 2006). Debido a estos descubrimientos, ha crecido el interés en la manipulación del perfil de ácidos grasos de la grasa láctea mediante la modificación de las características y la composición de la dieta ofrecida a los animales, especialmente la inclusión de fuentes de grasa vegetales ricas en ácidos grasos insaturados (Shingfield *et al.*, 2013; Nudda *et al.*, 2014).

Estudios realizados con cabras indican que la adición de aceites vegetales a su dieta resulta en cambios notables en los contenidos de ácidos grasos de la grasa láctea por efectos a nivel ruminal y mamario (Mele *et al.*, 2008; Bernard *et al.*, 2009; Martínez Marín *et al.*, 2011). Está bien establecido que el aumento de los ácidos grasos intermediarios de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea depende en gran medida de los efectos de las características y la composición de la dieta, especialmente su contenido en ácidos grasos insaturados, sobre los microorganismos ruminales (Shingfield *et al.*, 2013). A su vez, los cambios de la población microbiana del rumen se reflejan en los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados en la grasa láctea (Vlaeminck *et al.*, 2006a; Fievez *et al.*, 2012).

Establecer las relaciones de los isómeros de la biohidrogenación ruminal con los ácidos grasos impares y ramificados de los lípidos microbianos en la grasa láctea es clave para interpretar el impacto de la dieta suministrada a las cabras sobre las poblaciones microbianas del rumen y su repercusión en los atributos nutritivos de la grasa láctea. Cabe destacar que no hemos encontrado trabajos publicados en este sentido. Por tanto, el **objetivo** del presente trabajo fue contribuir a esclarecer la relaciones entre los ácidos grasos de la leche derivados del metabolismo lipídico de las bacterias del rumen —ácidos grasos impares y ramificados e intermediarios de la biohidrogenación ruminal— en cabras.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo, se utilizaron los datos de composición de la grasa láctea de 112 muestras individuales obtenidas en una serie de cinco experimentos que investigaron los cambios de los ácidos grasos de la leche en respuesta a la inclusión de aceites vegetales en la dieta de cabras. En dichos experimentos, se utilizó una dieta basal común con heno de alfalfa y un concentrado granulado (Tabla 1.1). En los experimentos 1 y 2 (Martínez Marín *et al.*, 2011; 2013b), los tratamientos fueron un control (dieta basal sin aceite añadido) y la misma dieta basal a la que se añadieron 48 g/d de aceite de girasol alto oleico, aceite de girasol normal o aceite de lino. En los experimentos 3, 4 y 5 (Martínez Marín *et al.*, 2012), los tratamientos fueron un control (dieta basal sin aceite añadido) y la misma dieta basal a la que se añadieron 30, 48 o 66 g/d de aceite de girasol alto oleico, aceite de girasol normal o aceite de lino.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Centro Usuario de Animales de Experimentación 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 en aquel momento (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos). Se utilizaron cabras de raza malagueña en segunda lactación durante el experimento 1 (72 ± 26 días de lactación y $45,9 \pm 3,7$ kg de peso vivo inicial) y en tercera lactación durante el experimento 2 (45 ± 5 días de lactación y $47,2 \pm 4,2$ kg de peso vivo inicial) y los experimentos 3, 4 y 5 (70 ± 5 días de lactación y

46,6±3,7 kg de peso vivo, al comienzo de la serie de experimentos). Los animales se alojaron individualmente en jaulas de 1,0 x 1,4 m con suelo permeable a los excrementos y dotadas de comederos y bebederos independientes. Las condiciones ambientales del alojamiento estuvieron controladas. El ordeño se realizó individualmente, una vez al día, a las 8:30 h utilizando el sistema de ordeño mecánico instalado en el alojamiento (DeLaval, Madrid, España) y apurado manual. La ración individual se preparó diariamente y se repartió en dos comidas iguales a las 9:30 y 16:00 h.

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LA GRASA LÁCTEA

Para la extracción de la grasa láctea, las muestras fueron atemperadas a 20 °C y sometidas a un proceso de doble centrifugación (Luna *et al.*, 2008). Los ésteres metílicos se prepararon mediante metanólisis básica de la grasa usando KOH disuelto en metanol. La composición de ácidos grasos de la grasa se determinó mediante cromatografía de gases (Agilent 6890 N Network System, Palo Alto, USA). Se utilizó una columna capilar de sílice fundido CP-Sil 88 de 100 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de grosor de la película interna (Varian, Middelburg, Holanda), siguiendo el método descrito por Luna *et al.* (2008). La cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos individuales se realizó con referencia a una grasa láctea de composición certificada (CRM 164; European Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Los isómeros individuales de los ácidos linoleico y α-linolénico fueron identificados por comparación con mezclas de composición conocida (Nu-Chek Prep. Inc., Elysian, USA) y con resultados previamente publicados.

Se identificaron y cuantificaron un total de 82 ácidos grasos en las muestras de grasa. Para el presente trabajo se seleccionaron como variables los ácidos grasos representativos de la síntesis lipídica microbiana (Vlaeminck *et al.*, 2006a; Fievez *et al.*, 2012) e isómeros con 18 átomos de carbono, relacionados de forma clara con las rutas de biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta (Martínez Marín *et al.*, 2015) (Tabla 1.2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa JMP 11 (SAS Institute, Cary, NC). La relación entre los contenidos de los ácidos grasos impares y ramificados y los de los isómeros intermediarios de la biohidrogenación ruminal, ajustados por los efectos aleatorios, se investigó mediante coeficientes de correlación de Pearson, siguiendo el procedimiento descrito por Vlaeminck

TABLA I.1. Composición de las dietas utilizadas en los experimentos incluidos en el estudio (CON), dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).

	Martínez Marín <i>et al.</i> (2011) ^a										Martínez Marín <i>et al.</i> (2012b) ^b										Martínez Marín <i>et al.</i> (2013b) ^b					
	EXP.1			EXP.2			EXP.3				EXP.4			EXP.5			CON		GAO		GN		LIN			
	CON	GAO	GN	LIN	CON	GAO	CON	GN	CON	GN	CON	GN	CON	GN	LIN	CON	GN	CON	GAO	GN	CON	GN	LIN			
Cabras por tratamiento	16	16	16	16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
Dieta, g/d																										
Heno de alfalfa	500	500	500	500	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600			
Concentrado ^c	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200			
Aceite ^d																										
Girasol alto oleico	-	48	-	-	-	30	48	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Girasol normal	-	-	48	-	-	-	-	-	-	30	48	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48			
Lino	-	-	-	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	48	66	-	-	-	-	-	-	48			
Ácidos grasos aportados por el aceite, g/d																										
C16:0	-	1,8	2,9	2,6	-	1,1	1,8	2,5	-	1,8	2,9	4,0	-	1,6	2,6	3,5	-	1,8	2,9	-	1,8	2,9	2,6			
C18:0	-	1,4	2,0	1,8	-	0,9	1,4	2,0	-	1,3	2,0	2,8	-	1,2	1,8	2,5	-	1,4	2,0	-	1,4	2,0	1,8			
C18:1 <i>cis</i> -9	-	41,0	14,2	10,0	-	25,6	41,0	56,3	-	8,9	14,2	19,5	-	6,3	10,0	13,8	-	41,0	14,2	-	41,0	14,2	10,0			
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	-	2,7	27,9	8,0	-	1,7	2,7	3,7	-	17,4	27,9	38,3	-	5,0	8,0	11,0	-	2,7	27,9	-	2,7	27,9	8,0			
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	-	-	-	23,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0	23,9	32,9	-	-	-	-	-	-	23,9			

^aLa dieta basal aportó 4,8, 0,7, 5,5, 14,2 y 3,0 g/d de C16:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12 y C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, respectivamente, calculado según INRA (2002).

^bLa dieta basal aportó 5,1, 0,8, 6,9, 14,4 y 3,4 g/d de C16:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12 y C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, respectivamente, calculado según INRA (2002).

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

^dIncluido en el concentrado respectivo.

et al. (2006a). El nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. Para el cálculo de los contenidos ajustados de cada uno de los isómeros por los efectos aleatorios, en primer lugar se crearon modelos de regresión mixtos (con efectos fijos y aleatorios), de acuerdo con el procedimiento indicado por Sauvant *et al.* (2008). En los modelos de regresión, el contenido de cada isómero fue la variable dependiente y el contenido de cada ácido graso impar y ramificado fue la variable independiente (covariable). El número de experimento (1 a 5), el tratamiento anidado dentro de experimento y sus respectivas interacciones con la covariable fueron los efectos aleatorios en los modelos. Los modelos de regresión obtenidos se utilizaron para la predicción condicional del contenido de los isómeros (contenidos ajustados) a partir de las covariables y de la influencia de los efectos aleatorios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS EXPERIMENTALES Y DATOS UTILIZADOS

El ácido oleico y el ácido linoleico fueron mayoritarios en las dietas con aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol normal, respectivamente. Las dietas con aceite de lino tuvieron un perfil de ácidos grasos más equilibrado aunque el ácido α -linolénico fue mayoritario (Tabla 1). Respecto a las dietas basales, las diferencias entre experimentos fueron mínimas ya que el único cambio fue la cantidad de heno de alfalfa suministrada en Martínez Marín *et al.* (2011) y Martínez Marín *et al.* (2012, 2013b) (500 vs 600 g/d). Dado que, en los experimentos cuyos datos fueron incluidos en el presente trabajo, las cabras se mantuvieron en las mismas condiciones de alojamiento y manejo y que prácticamente no hubo diferencias en la dieta basal (Tabla 1), todas las relaciones entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros intermediarios de la biohidrogenación ruminal observadas en la leche tuvieron que deberse a los efectos de los aceites añadidos a la dieta sobre el ambiente ruminal y, adicionalmente, sobre el metabolismo mamario.

Las Tablas 2 y 3 muestran los estadísticos descriptivos de los ácidos grasos incluidos en el presente estudio. El contenido medio de OBCFA en la grasa láctea fue 2,15% ($\pm 0,413$). Los ácidos grasos mayoritarios de este grupo fueron C15:0 y C17:0, en coincidencia con los resultados presentados por Alonso *et al.* (1999).

Tabla 1.2. Estadísticos descriptivos (media \pm desviación típica y rango) de los contenidos de ácidos grasos intermedarios de la biohidrogenación ruminal (expresados en g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) en las muestras de grasa láctea incluidas en el estudio (CON, dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).

	CON (n=28)	GAO (n=28)	GN (n=28)	LIN (n=28)
C18:1 <i>trans</i> -4	0,013 \pm 0,0060	0,042 \pm 0,0138	0,027 \pm 0,0086	0,023 \pm 0,0067
C18:1 <i>trans</i> -5	0,014 \pm 0,0059	0,041 \pm 0,0137	0,025 \pm 0,0094	0,022 \pm 0,0067
C18:1 <i>trans</i> -6/7/8	0,168 \pm 0,0447	0,463 \pm 0,1677	0,361 \pm 0,1143	0,137-0,470
C18:1 <i>trans</i> -9	0,193 \pm 0,0415	0,140-0,290	0,374 \pm 0,0878	0,165-0,448
C18:1 <i>trans</i> -10	0,323 \pm 0,1526	0,146-0,708	0,864 \pm 0,8015	0,115-0,734
C18:1 <i>trans</i> -11	0,996 \pm 0,3940	0,378-1,900	3,498 \pm 1,7497	0,809-5,925
C18:1 <i>cis</i> -12	0,139 \pm 0,0474	0,049-0,238	0,273 \pm 0,2193	0,114-1,451
C18:1 <i>cis</i> -13	0,039 \pm 0,0080	0,022-0,059	0,051 \pm 0,0103	0,035-0,089
C18:1 <i>cis</i> -15	0,055 \pm 0,0090	0,036-0,074	0,076 \pm 0,0157	0,080-0,628
C18:1 <i>trans</i> -15	0,303 \pm 0,0600	0,211-0,471	0,358 \pm 0,1205	0,219-1,109
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15	0,040 \pm 0,0129	0,011-0,073	0,039 \pm 0,0131	0,007-0,151
C18:2 <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13	0,061 \pm 0,0094	0,043-0,079	0,071 \pm 0,0188	0,079-0,252
C18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12	0,031 \pm 0,0085	0,019-0,052	0,038 \pm 0,0121	0,023-0,110
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,037 \pm 0,0108	0,017-0,077	0,063 \pm 0,0360	0,117-2,204
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,615 \pm 0,2275	0,331-1,211	1,668 \pm 0,7893	0,496-2,709
C18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11	0,013 \pm 0,0063	0,000-0,027	0,024 \pm 0,0091	0,010-0,030
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13	0,011 \pm 0,0053	0,000-0,022	0,014 \pm 0,0031	0,016-0,045
C18:2 <i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14	0,007 \pm 0,0030	0,000-0,013	0,009 \pm 0,0056	0,009-0,045
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13	0,006 \pm 0,0024	0,000-0,009	0,007 \pm 0,0035	0,007-0,042
C18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11	0,013 \pm 0,0057	0,000-0,023	0,026 \pm 0,0107	0,011-0,041
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15	0,007 \pm 0,0031	0,000-0,015	0,010 \pm 0,0088	0,014-0,075
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,037 \pm 0,0087	0,021-0,054	0,033 \pm 0,0075	0,037-0,325
Sumatorios				
C18:1 <i>trans</i>	1,707 \pm 0,5718	0,950-2,972	5,149 \pm 2,4388	1,253-7,322
C18:1 <i>cis</i>	0,233 \pm 0,0546	0,132-0,353	0,400 \pm 0,2277	0,247-1,928
C18:2 no conjugado	0,168 \pm 0,0250	0,118-0,227	0,212 \pm 0,0397	0,299-2,594
C18:2 conjugado	0,665 \pm 0,2334	0,374-1,273	1,748 \pm 0,7998	0,582-2,827
C18:1 total	1,940 \pm 0,6081	1,123-3,273	5,549 \pm 2,6157	1,529-9,166
C18:2 total	0,834 \pm 0,2499	0,525-1,466	1,959 \pm 0,8103	0,900-4,764

En el caso de los isómeros intermediarios de la biohidrogenación ruminal, los contenidos medios de los ácidos mono, di y triinsaturados fueron 5,19% ($\pm 2,637$), 2,04% ($\pm 1,157$) y 0,07% ($\pm 0,056$), respectivamente. Los isómeros mayoritarios fueron los ácidos vaccénico y ruménico en todos los casos. El ácido C18:1 *trans*-10 fue el tercer isómero más abundante en las muestras de grasa de las dietas sin aceite y con aceite de girasol alto oleico y aceite de girasol normal, mientras que dicha posición la ocupó el ácido C18:2 *trans*-11,*cis*-15 en las muestras de las dietas con aceite de lino. Considerando los grupos de isómeros, el grupo de C18:1 *trans* se encontró en proporciones muy superiores a los C18:1 *cis* en todas las muestras de grasa. El grupo de C18:2 conjugados tuvo proporciones superiores a los C18:2 no conjugados, aunque sus proporciones estuvieron más equilibrados en las muestras de las dietas con aceite de lino. La distribución de los isómeros y las diferencias de sus grupos entre las muestras de grasa de las dietas utilizadas en el presente trabajo coincide con las observaciones de Mele *et al.* (2008) y Bernard *et al.* (2009).

RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA LÁCTEA

En el presente estudio se obtuvieron numerosas correlaciones significativas entre las variables estudiadas (Tabla 1.4), lo que ratificaría las profundas relaciones existentes entre los isómeros de la biohidrogenación ruminal y los OBCFA debido a la participación de las especies bacterianas del rumen en la producción de ambos tipos de ácidos grasos (Vlaeminck *et al.*, 2006a). En general, los OBCFA se correlacionaron negativamente con los isómeros mono y diinsaturados. Hubo más correlaciones significativas de los OBCFA con los C18:1 *trans* (especialmente, *trans*-4 a *trans*-11) y con los C18:2 conjugados (sobre todo, los derivados del ácido linoleico) que con los C18:1 *cis* y los C18:2 no conjugados. Se observó que los ácidos grasos iso de cadena impar se relacionaron en igual medida con los distintos grupos de isómeros. Por el contrario, los ácidos grasos anteiso de cadena impar se comportaron de forma diferente entre ellos. C13:0 anteiso se correlacionó significativamente con la mayoría de los grupos de isómeros mientras que C15:0 anteiso solo se correlacionó significativamente con los C18:2 conjugados.

Tabla 1.3. Estadísticos descriptivos (media \pm desviación típica y rango) de los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados (expresados en g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos) en las muestras de grasa láctea incluidas en el estudio (CON, dieta basal sin aceite añadido; GAO, dieta con aceite de girasol alto oleico; GN, dieta con aceite de girasol normal; LIN, dieta con aceite de lino).

	CON (n=28)	GAO (n=28)	GN (n=28)	LIN (n=28)
C13:0 iso	0,019 \pm 0,0078	0,019 \pm 0,0065	0,010-0,037	0,018 \pm 0,0047
C13:0 anteiso	0,061 \pm 0,0293	0,038 \pm 0,0121	0,020-0,063	0,043 \pm 0,0138
C14:0 iso	0,050 \pm 0,0092	0,046 \pm 0,0079	0,035-0,065	0,047 \pm 0,0134
C15:0 iso	0,136 \pm 0,0185	0,123 \pm 0,0190	0,084-0,168	0,131 \pm 0,0275
C15:0 anteiso	0,275 \pm 0,0520	0,257 \pm 0,0661	0,177-0,405	0,249 \pm 0,0684
C16:0 iso	0,144 \pm 0,0329	0,139 \pm 0,0881	0,084-0,568	0,123 \pm 0,0323
C15:0	0,831 \pm 0,2131	0,732 \pm 0,1517	0,447-1,099	0,680 \pm 0,1360
C15:1 <i>cis</i> -9	0,053 \pm 0,0150	0,044 \pm 0,0126	0,018-0,082	0,046 \pm 0,0123
C17:0	0,399 \pm 0,0514	0,374 \pm 0,0687	0,273-0,581	0,339 \pm 0,0719
C17:1 <i>cis</i> -9	0,209 \pm 0,0423	0,156-0,307	0,088-0,418	0,140 \pm 0,0313
Sumatorios e índices				
C15 total ^a	0,884 \pm 0,2107	0,536-1,460	0,488-1,136	0,726 \pm 0,1306
C17 total ^b	0,680 \pm 0,0687	0,472-0,810	0,403-0,998	0,478 \pm 0,0177
C15/C17	1,442 \pm 0,2357	0,916-1,837	0,725-2,300	1,534 \pm 0,1939
C13 iso/anteiso	0,373 \pm 0,2019	0,092-0,827	0,216-1,223	0,452 \pm 0,1961
C15 iso/anteiso	0,503 \pm 0,0883	0,334-0,688	0,316-0,681	0,542 \pm 0,1075

^a Suma de C15:0 y C15:1 *cis*-9.

^b Suma de C17:0 y C17:1 *cis*-9.

Es destacable que los ácidos grasos iso y anteiso impares tuvieran pocas relaciones negativas con los isómeros monoinsaturados y ninguna con los C18:2 conjugados derivados de la biohidrogenación ruminal del ácido α -linolénico (Martínez Marín *et al.*, 2015). Respecto a los ácidos grasos iso de cadena par, C14:0 iso se comportó de forma similar a los iso impares, en tanto que C16:0 iso no tuvo correlaciones significativas con ninguno de los grupos de isómeros.

De acuerdo con Harfoot y Hazlewood (1997), las bacterias involucradas en la biohidrogenación ruminal pueden agruparse en dos grandes grupos. El grupo A es responsable principalmente de la biohidrogenación de los ácidos linoleico y α -linolénico hasta C18:1 *trans*-11, vía C18:2 *cis*-9,*trans*-11 y C18:2 *trans*-11,*cis*-15, respectivamente. Las bacterias del grupo B convierten los ácidos grasos monoinsaturados a C18:0 y tienen la capacidad de producir C18:1 *trans*-15 y C18:1 *cis*-15 a partir de C18:2 *trans*-11,*cis*-15, aunque dichos monoinsaturados no son convertidos a C18:0 por ninguna especie conocida. Solamente se han identificado un limitado número de especies en ambos grupos. Las bacterias responsables de la biohidrogenación son mayoritariamente celulolíticas, destacando *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Butyrivibrio hungatei* que pertenecen al grupo A, mientras que la única especie del grupo B identificada hasta la fecha es *Butyrivibrio proteoclasticus* (Shingfield y Wallace, 2014). Por otro lado, las poblaciones bacterianas también se pueden agrupar según su distribución en el rumen en: bacterias asociadas a las partículas del alimento y bacterias que permanecen en la fase líquida. Las bacterias con actividad celulolítica se encuentran en mayor proporción en la fase sólida (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). En general, las bacterias de la fase líquida son relativamente ricas en C15:0 anteiso en comparación con las bacterias de la fase sólida (Vlaeminck *et al.*, 2006b; Bessa *et al.*, 2009). No obstante, existen amplias diferencias entre especies y cepas, algunas bacterias con actividad celulolítica destacan por su elevado contenido en C14:0 iso o C15:0 iso y otras con actividad amilolítica se caracterizan por un bajo contenido en ácidos grasos ramificados (Vlaeminck *et al.*, 2006a).

TABLA I.4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea de cabras. Solamente se presentan las correlaciones significativas ($P < 0,05$).

	C13:0 iso	C13:0 anteiso	C14:0 iso	C15:0 iso	C15:0 anteiso	C16:0 iso	C15:1 <i>cis</i> -9	C17:0	C17:1 <i>cis</i> -9	C15 total	C17 total	C15/ C17	C13 iso/ anteiso	C15 iso/ anteiso	OBC- FA
C18:1 <i>trans</i> -4	-0,56	-0,49	-0,19	-0,26					-0,55	-0,34	0,20	0,51	-0,20	-0,24	
C18:1 <i>trans</i> -5		-0,58	-0,30	-0,24				-0,49	-0,29	0,29	0,48	-0,24			
C18:1 <i>trans</i> -6/7/8		-0,49	-0,40	-0,33				-0,71	-0,53	0,39	0,41	-0,26		-0,29	
C18:1 <i>trans</i> -9		-0,36	-0,38	-0,24		-0,22		-0,82	-0,72	0,47	0,24	-0,45			
C18:1 <i>trans</i> -10		-0,51	-0,40	-0,22	0,23	0,22	0,33	-0,55	-0,50	0,44	0,30	-0,39		-0,45	
C18:1 <i>trans</i> -11	-0,23	-0,28	-0,30					-0,82	-0,65	0,27	0,30				
C18:1 <i>cis</i> -12		-0,49	-0,30		0,28		0,20	-0,55	0,28	0,32	0,38				
C18:1 <i>cis</i> -13		-0,20	-0,21	-0,23	0,30			-0,67	0,46	0,38	-0,34				
C18:1 <i>cis</i> -15		-0,45			0,45	0,30		-0,40	-0,23	0,36	0,53	-0,51		0,22	
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15				0,23	0,21	0,27	-0,30	-0,41	0,30	0,25	0,39				
C18:2 <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13	-0,26			-0,31				-0,24	-0,30	0,23	0,50	-0,49		-0,20	
C18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12		-0,21	-0,22	-0,20	0,38	0,33	0,29	-0,57	-0,20	0,50	0,34	-0,20		0,20	
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15		-0,30	-0,33	-0,23	-0,26	-0,25		-0,38	-0,20	-0,66	0,38	-0,44			
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	-0,34		-0,36	-0,38	-0,21			-0,44	-0,59	0,55	0,55	-0,33			
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13				0,20	0,29		-0,26	-0,20		0,48	0,48	-0,21		0,23	
C18:2 <i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14						0,37	-0,26	-0,35	0,35	-0,23	0,46				
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13						0,20	-0,37	-0,42	-0,48	-0,48	0,60				
C18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11						-0,20	-0,28	-0,64	-0,21	0,24	0,24				
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15	-0,22							-0,29	-0,28	-0,72	0,36	-0,46			
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	-0,23			-0,27		-0,28	-0,35	-0,87	-0,28	-0,72	0,35	-0,46			
C18:1 <i>trans</i>		-0,27	-0,27	-0,19	-0,19			-0,52	-0,20						
C18:1 <i>cis</i>		-0,19	-0,19	-0,19	-0,19			-0,38	-0,20						
C18:2 no conjugado	-0,30				-0,25			-0,65	-0,65	0,39	0,39	-0,43			
C18:2 conjugado	-0,23			-0,27		-0,23		-0,86	-0,66	0,37	0,36	-0,39			
C18:1 total	-0,27			-0,24		-0,23		-0,59	-0,49	0,32	0,32	-0,30			
C18:2 total		-0,20	-0,30	-0,24	0,34			-0,44							
C18:1/C18:2	-0,61														

Las relaciones observadas en el presente trabajo entre los OBCFA y los isómeros de la biohidrogenación ruminal indicarían que la adición de aceites a la dieta de las cabras tuvo dos efectos simultáneos: un efecto negativo sobre las bacterias celulolíticas, que resultó en una menor absorción de ácidos grasos ramificados en intestino delgado, y también tuvo un efecto negativo sobre los grupos A y B de bacterias de la biohidrogenación, que resultó en una mayor absorción de isómeros en el intestino, en coincidencia con lo observado por Maia *et al.* (2007, 2010). En virtud de lo expuesto en el párrafo anterior, el doble efecto observado confirmaría que los grupos A y B de la biohidrogenación y las bacterias celulolíticas se solapan y tienen especies bacterianas comunes. Adicionalmente, los índices C13:0 iso/anteiso y C15:0 iso/anteiso se correlacionaron de forma positiva y negativa, respectivamente, con el índice de isómeros mono y diinsaturados (C18:1/C18:2), debido a la correlación negativa de dicho índice con C13:0 anteiso y a su correlación positiva con C15:0 anteiso (Tabla 1.4). Por tanto, las condiciones que favorecieron la acumulación relativa de isómeros monoinsaturados respecto a los diinsaturados redujeron la llegada a intestino de C13:0 anteiso sin efecto sobre C13:0 iso y aumentaron la de C15:0 anteiso sin efecto sobre C15:0 iso. Estos resultados sugerirían que algunas bacterias del grupo B podrían pertenecer a especies con actividad celulolítica especialmente ricas en C13:0 anteiso en comparación con su contenido en C13:0 iso como *Fibrobacter succinogenes* y algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, mientras que especies bacterianas ricas en C15:0 anteiso como *Prevotella ruminicola* y *Eubacterium ruminantium* tendrían poca relevancia en el proceso de biohidrogenación ruminal y su número relativo aumentaría cuando dicho proceso se ve alterado (Vlaeminck *et al.*, 2006b).

En el grupo de ácidos grasos impares de cadena lineal, C15:0, C15:1 *cis*-9 y C15 total mostraron un patrón menos claro de relaciones con los isómeros de la biohidrogenación que C17:0, C17:1 *cis*-9 y C17 total. Además, el índice C15/C17 mostró una correlación positiva con la práctica totalidad de los isómeros (Tabla 1.4). En conjunto, estos resultados sugieren que las mismas condiciones que favorecieron la producción ruminal de isómeros (en este caso, la inclusión de aceites en la ración) tuvieron un menor efecto negativo en el contenido de C15 total de la grasa láctea que en el de C17 total. El efecto negativo pudo ocurrir tanto a nivel ruminal como mamario. El origen ruminal supone una parte importante de los contenidos de C15:0 y C17:0 encontrados en la grasa láctea, pero la ubre tiene capacidad de sintetizar *de novo* C15:0 y C17:0 a partir de ácido propiónico (Massart-Leën *et al.*, 1983; Vlaeminck *et al.*, 2015). Las condiciones mencionadas también afectaron negativamente a la actividad de la Δ -9 desaturasa mamaria sobre C17:0 pero no sobre C15:0, medida por los índices de desaturación respectivos, resultando en una menor producción de C17:1 *cis*-9. De hecho, todos los coeficientes de correlación de

C17:1 *cis*-9 con los isómeros fueron significativamente negativos (Tabla 1.4). Fievez *et al.* (2003) indicaron el origen mamario de C17:1 *cis*-9 y el efecto negativo del enriquecimiento de la ración con ácidos grasos de cadena larga sobre la enzima Δ -9 desaturasa mamaria es bien conocido (Chilliard y Ferlay, 2004). El efecto negativo diferencial sobre la desaturación de C15:0 y C17:0 es llamativo, pero no disponemos de ninguna explicación al respecto.

CONCLUSIONES

Los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal son componentes únicos de la grasa láctea de los rumiantes. Este trabajo presenta por primera vez las relaciones entre los contenidos de ambos grupos de ácidos grasos en la grasa láctea de cabras. En general, las correlaciones fueron negativas. Los ácidos grasos ramificados y C17 total mostraron el mayor número de correlaciones significativas con los isómeros *trans* monoinsaturados con dobles enlaces en las posiciones 4 a 11 y los C18:2 conjugados derivados del ácido linoleico. Los cambios opuestos simultáneos en los contenidos de algunos ácidos grasos de ambos grupos permitieron identificar a determinadas especies bacterianas del rumen por su doble papel tanto en la degradación de los carbohidratos como en la biohidrogenación de los ácidos grasos de la dieta. Las relaciones negativas observadas también reflejaron cambios en la actividad enzimática de la glándula mamaria. En conjunto, los resultados obtenidos indican que las relaciones entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea pueden utilizarse como un indicador no invasivo de los efectos de la dieta suministrada a los animales sobre las bacterias del rumen y la actividad de las enzimas de la ubre. Por otro lado, conocer el sentido de dichas relaciones es relevante para valorar las cualidades nutritivas de la grasa láctea desde el punto de vista de la salud humana cuando se realicen modificaciones en la dieta de los animales.



Capítulo 2

RELACIÓN DE LA RACIÓN CONSUMIDA CON LOS ÁCIDOS GRASOS IMPARES Y RAMIFICADOS DE LA LECHE EN CABRAS



RESUMEN

Los contenidos en ácidos grasos impares y ramificados (OBCFA) determinados mediante cromatografía gaseosa en 94 muestras de grasa láctea se utilizaron para identificar el tipo de ración consumida por cabras mediante análisis discriminante lineal. Las dietas consistieron en un control (CON), sin aceite añadido, y la misma dieta enriquecida con aceite de girasol alto oleico (GAO), aceite de girasol normal (GN) o aceite de lino (LIN). De un total de 21 variables, cuatro fueron seleccionadas como predictores válidos (C7:0, metiltetradecanoato, C15:0 iso y la suma de C17:0+C17:1 *cis*-9). La prueba de Wilks fue altamente significativa ($P < 0,001$), indicando que el análisis discriminante era aplicable a los datos del presente estudio. La primera función discriminante canónica explicó el 90,9% de la varianza observada entre los grupos. Las distancias de Mahalanobis entre el tratamiento CON y los tratamientos con aceite fueron similares (5,1 a 6,6; $P < 0,001$). Entre los tratamientos con aceite, la mayor distancia se observó entre los tratamientos GN y GAO (0,95; $P < 0,05$). No hubo diferencias significativas en las distancias del tratamiento LIN con los tratamientos GAO (0,27; $P = 0,58$) y GN (0,48; $P = 0,28$). De acuerdo con los valores de los centroides, la función 1 discriminó el tratamiento CON de los tratamientos con aceite. Los coeficientes estandarizados indicaron que las variables con mayor capacidad discriminante en la función 1 fueron C7:0 en sentido negativo y metiltetradecanoato en sentido positivo. La función 2 discriminó débilmente al tratamiento GN del tratamiento GAO. La mayor capacidad discriminante en esta función se debió a C15:0 iso en sentido positivo y a la suma C17:0+C17:1 *cis*-9 en sentido negativo. La tasa de acierto de las funciones discriminantes de Fisher fue muy superior en las observaciones del tratamiento CON (82,1%) que en los tratamientos con aceite (31,8, 50,0 y 40,9% en los tratamientos GAO, GN y LIN, respectivamente). Las observaciones del tratamiento GAO se confundieron en gran medida con las del tratamiento LIN, y las de este tratamiento se confundieron principalmente con las del tratamiento GN. Los resultados obtenidos indican que los OBCFA de la grasa láctea no sirven para identificar el tipo de aceite vegetal incluido en la

ración de cabras, pero permiten diferenciar la grasa láctea de las raciones con y sin aceite añadido mediante análisis discriminante lineal.

Palabras clave: Grasa láctea, aceite vegetal, análisis discriminante lineal.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos impares y ramificados (OBCFA) son componentes singulares de la grasa de la carne y la leche de los rumiantes, siendo estos alimentos los únicos aportes importantes de OBCFA a la dieta humana. Los OBCFA de cadena media y larga son sintetizados por los microorganismos ruminales a partir de ácidos grasos volátiles producidos durante la degradación de los carbohidratos y los aminoácidos presentes en la ración suministrada a los animales (Harfoot and Hazlewood, 1997). Su bajo punto de fusión hace que sean incorporados preferentemente en las membranas celulares microbianas para contribuir al mantenimiento de su fluidez (Or-Rashid *et al.*, 2007). La mayoría de los OBCFA microbianos absorbidos en el intestino delgado se incorporan a la grasa láctea sin modificaciones, pero en algunos casos puede ocurrir su Δ -9 desaturación y elongación (Fievez *et al.*, 2012; Vlaeminck *et al.*, 2015). Adicionalmente, los ácidos grasos impares de cadena más corta (5 a 11 átomos de carbono) y los ácidos grasos ramificados metil sustituidos pueden ser sintetizados *de novo* por la glándula mamaria, utilizando como sustratos el ácido propiónico y su derivado el ácido metilmalónico, respectivamente, en lugar de acetyl-CoA (Massart-Leën *et al.*, 1983; French *et al.*, 2012).

La cuantificación de los OBCFA de la grasa láctea ha despertado gran interés en los últimos años. Debido a su origen y las relaciones encontradas con la dieta y la población microbiana ruminal, se considera que los OBCFA pueden ser utilizados como indicadores biológicos de la función ruminal (Vlaeminck *et al.*, 2006; Fievez *et al.*, 2012). Otro motivo de interés son los potenciales efectos inhibitorios de algunos de ellos sobre células tumorales (Wongtangtintharn *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2013) y la relación de su consumo con el menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Jenkins *et al.*, 2015). Adicionalmente, los ácidos grasos metil sustituidos se consideran exclusivos de la leche caprina y ovina, ya que no aparecen en la leche de vaca (Massart-Leën *et al.*, 1981, Ha y Lindsay, 1993), y son relevantes por las propiedades organolépticas que confieren a los productos lácteos (Woo y Lindsay, 1984).

Es bien sabido que la adición de suplementos lipídicos a la ración de las hembras rumiantes puede modificar el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea por diversos mecanismos a nivel ruminal y mamario (Bauman *et al.*, 2016). Recientes estudios han reportado los efectos de la adición de aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados a la dieta sobre los ácidos grasos de la leche caprina, incluyendo diversos OBCFA (Mele *et al.*, 2008; Bernard *et al.*, 2009; Ollier *et al.*, 2009; Martínez Marín *et al.*, 2011). A pesar de lo anterior, no hemos encontrado trabajos publicados en los que se hayan utilizado los contenidos de OBCFA de la leche como indicadores de la adición de aceites vegetales a la dieta de cabras.

El análisis discriminante es una técnica estadística multivariada que puede utilizarse para construir un modelo predictivo de discriminación de grupos a partir de predictores observados y clasificar las observaciones en uno de los grupos identificados. El análisis discriminante lineal se ha utilizado con éxito para diferenciar la ración consumida por los animales a partir de determinados ácidos grasos identificados y cuantificados en la grasa láctea de vaca y cabra mediante cromatografía gaseosa (Gaspardo *et al.*, 2010; Martínez Marín *et al.*, 2012a).

El objetivo del presente trabajo fue utilizar el análisis discriminante lineal para determinar la utilidad específica de los OBCFA cuantificados en la grasa láctea como predictores de la inclusión de aceites vegetales de diferente grado de insaturación en la dieta suministrada a cabras.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron los datos de composición de 94 muestras individuales de grasa láctea obtenidas en una serie de cinco experimentos que investigaron los cambios de los ácidos grasos de la leche en respuesta a la inclusión de aceites vegetales en la dieta de cabras (Martínez Marín *et al.*, 2011, 2012b, 2013b). Los procedimientos experimentales cumplieron con la normativa española vigente sobre protección de animales de experimentación. En todos los experimentos se utilizó una dieta basal común con heno de alfalfa y un concentrado granulado, que sirvió de control, a la que se añadió 48 g/d de aceite de girasol alto oleico, girasol normal o lino, de acuerdo con los tratamientos del diseño experimental (**Tabla 2.1**). Los animales utilizados fueron cabras de raza Malagueña múltiparas que se alojaron individualmente en jaulas de 1,0 x 1,4 m con suelo permeable a los excrementos y dotadas de comederos y bebederos independientes. La ración se preparó diariamente para

TABLA 2.1. Composición de las raciones utilizadas (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).

	Martínez Marín <i>et al.</i> (2011) ^a				Martínez Marín <i>et al.</i> (2012b) ^b				Martínez Marín <i>et al.</i> (2013b) ^b					
	EXP.1		EXP.2		EXP.3		EXP.4		EXP.5		EXP.5			
	CON	GAO	GN	LIN	CON	GAO	CON	GN	CON	LIN	CON	GAO	GN	LIN
Cabras por tratamiento	16	16	16	16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Dieta, g/d														
Heno de alfalfa	500	500	500	500	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Concentrado ^c	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
Aceite ^d														
Girasol alto oleico	-	48	-	-	-	48	-	-	-	-	-	48	-	-
Girasol normal	-	-	48	-	-	-	-	48	-	-	-	-	-	48
Lino	-	-	-	48	-	-	-	-	-	48	-	-	-	48
Ácidos grasos aportados por el aceite, g/d														
C16:0	-	1,8	2,9	2,6	-	1,8	-	2,9	-	2,6	-	1,8	2,9	2,6
C18:0	-	1,4	2	1,8	-	1,4	-	2	-	1,8	-	1,4	2	1,8
C18:1 <i>cis</i> -9	-	41	14,2	10	-	41	-	14,2	-	10	-	41	14,2	10
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	-	2,7	27,9	8	-	2,7	-	27,9	-	8	-	2,7	27,9	8
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	-	-	-	23,9	-	-	-	-	-	23,9	-	-	-	23,9

^aLa dieta basal aportó 4,8, 0,7, 5,5, 14,2 y 3,0 g/d de C16:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12 y C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, respectivamente, calculado según INRA (2002).

^bLa dieta basal aportó 5,1, 0,8, 6,9, 14,4 y 3,4 g/d de C16:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12 y C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, respectivamente, calculado según INRA (2002).

^cComposición (g/kg): maíz, 375; cebada, 374,9; harina de soja, 200; premezcla de vitaminas y minerales (Máxi Nutra/Ovejas, NutraI, Madrid, España), 30; aglomerante (Exal, Tolsa, Madrid, España), 20; antioxidante (Luctanox, Lucta, Barcelona, España), 0,1.

^dIncluido en el concentrado respectivo.

cada una de las cabras y se repartió en dos comidas iguales a las 9:30 y 16:00 h. El ordeño se realizó individualmente, una vez al día, a las 8:30 h utilizando el sistema de ordeño mecánico instalado en el alojamiento (DeLaval, Madrid, España) y apurado manual. Las muestras de leche individuales se recogieron en el último día de cada período experimental y se conservaron congeladas a -20°C hasta su análisis cromatográfico.

Los procedimientos de identificación y cuantificación de los ácidos grasos de la grasa láctea están detallados en Martínez Marín *et al.* (2012b). La grasa láctea se extrajo por doble centrifugación y los ésteres metílicos se obtuvieron por metilación básica (KOH/methanol). La composición de ácidos grasos de la grasa se determinó mediante cromatografía de gases (Agilent 6890 N Network System, Palo Alto, USA), utilizando una columna capilar de sílice fundido CP-Sil 88 (100 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de grosor de la película interna (Varian, Middelburg, Holanda). Los resultados se agruparon en cuatro clases de acuerdo con la ración suministrada a los animales: sin aceite añadido (CON), o con aceite de girasol alto oleico (GAO), aceite de girasol normal (GN) o aceite de lino (LIN).

Para el estudio se utilizó el programa SAS University Edition 3.5 (SAS Institute, Cary, NC). En primer lugar, los ácidos grasos y las relaciones entre ácidos grasos a incluir como variables predictoras en el modelo se seleccionaron con el procedimiento STEPDISC, con probabilidades para entrar y salir del modelo de 0,10 y 0,20, respectivamente. A continuación, se utilizó el procedimiento DISCRIM para determinar los coeficientes de las variables predictoras en las funciones discriminantes lineales. En este procedimiento, se incluyó la opción CROSSVALIDATE para comprobar la robustez de las funciones obtenidas. El procedimiento ANOVA se utilizó para la interpretación de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de manejo y alojamiento y las raciones basales fueron prácticamente idénticas (**Tabla 2.1**), todos los cambios en los contenidos de OBCFA de la leche estarían relacionados con el efecto de los aceites añadidos a la ración sobre el metabolismo ruminal y/o mamario. Los ácidos oleico (C18:1 *cis*-9) y linoleico (C18:2 *cis*-9,*cis*-12) linoleico fueron mayoritarios en los tratamientos GAO y GN, respectivamente. El tratamiento LIN fue el único que aportó cantidades relevantes de ácido α -linolénico (C18:3 *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15). El tratamiento CON no aportó otros ácidos grasos que los de la dieta basal, siendo mayoritario el ácido linoleico.

TABLA 2.2. Resultados del análisis discriminante (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).

	Coeficientes estandarizados			Matriz de estructura		
	Funciones			Funciones		
	1	2	3	1	2	3
C7:0	-1,55	-0,50	-0,09	0,02	-0,21	-0,64
Metiltetradecanoato	1,51	0,37	-0,88	0,48	-0,01	-0,80
C15:0 iso	0,33	0,75	0,37	0,36	0,53	0,27
C17:0 + C17:1 <i>cis</i> -9	0,72	-0,74	0,33	0,53	-0,68	0,28
Autovalores (<i>eigenvalues</i>)	1,22	0,12	0,01			
% de la varianza	90,9	8,9	0,2			
Correlación canónica	0,74	0,33	0,05			
Probabilidad	<0,001	0,12	0,88			
Centroides						
CON	1,65	0,01	-0,09			
GAO	-0,56	-0,44	0,06			
GN	-0,62	0,53	0,04			
LIN	-0,91	-0,09	-0,08			

En las muestras de grasa láctea se identificaron 21 OBCFA que eluyeron individualmente, de un total de 82 ácidos grasos. Tres OBCFA individuales y una suma fueron seleccionados como variables predictoras en el análisis discriminante (**Tabla 2.2**). La prueba de Wilks ($\lambda = 0,40$) fue altamente significativa ($P < 0,001$), indicando que el análisis discriminante era aplicable a los datos del presente estudio. La primera función discriminante canónica explicó el 90,9% de la varianza observada entre los grupos (**Figura 2.1**). Las correlaciones canónicas no fueron significativas en las funciones 2 y 3 ($P = 0,12$ y $0,88$, respectivamente). Las distancias de Mahalanobis entre el tratamiento CON y los tratamientos con aceite fueron similares (5,1 a 6,6; $P < 0,001$). Entre los tratamientos con aceite, la mayor distancia se observó entre los tratamientos GN y GAO (0,95; $P < 0,05$). No hubo diferencias en las distancias del tratamiento LIN con los tratamiento GAO (0,27; $P = 0,58$) y GN (0,48; $P = 0,28$).

De acuerdo con los valores de los centroides (Tabla 2.2, Figura 2.1), la función 1 discriminó el tratamiento CON de los tratamientos con aceite. Los coeficientes estandarizados indicaron que las variables con mayor capacidad discriminante en la función 1 fueron C7:0 en sentido negativo y metiltetradecanoato en sentido positivo. El análisis univariado de los datos mostró que no hubo diferencias en la suma de los contenidos de C7:0 y metiltetradecanoato ($P = 0,19$) ni en la suma de los contenidos de los ácidos grasos impares de cadena corta (C5:0, C7:0 y C9:0) y los ácidos grasos metil sustituidos (metil octanoato, metildecanoato, metiltetradecanoato y metildodecanoato) incluidos en el presente estudio ($P = 0,38$). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que el ácido propiónico que escapó al metabolismo hepático y estuvo disponible para la síntesis *de novo* en la glándula mamaria fue similar entre tratamientos, siendo incorporado a la grasa láctea previa conversión a ácido metilmalónico en mayor medida en las cabras que consumieron el tratamiento CON (Massart-Leën y Massart, 1981; Massart-Leën *et al.*, 1983; French *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, los tratamientos con aceite pudieron modificar el aroma de la leche en comparación con el tratamiento CON (Woo y Lindsay, 1984).

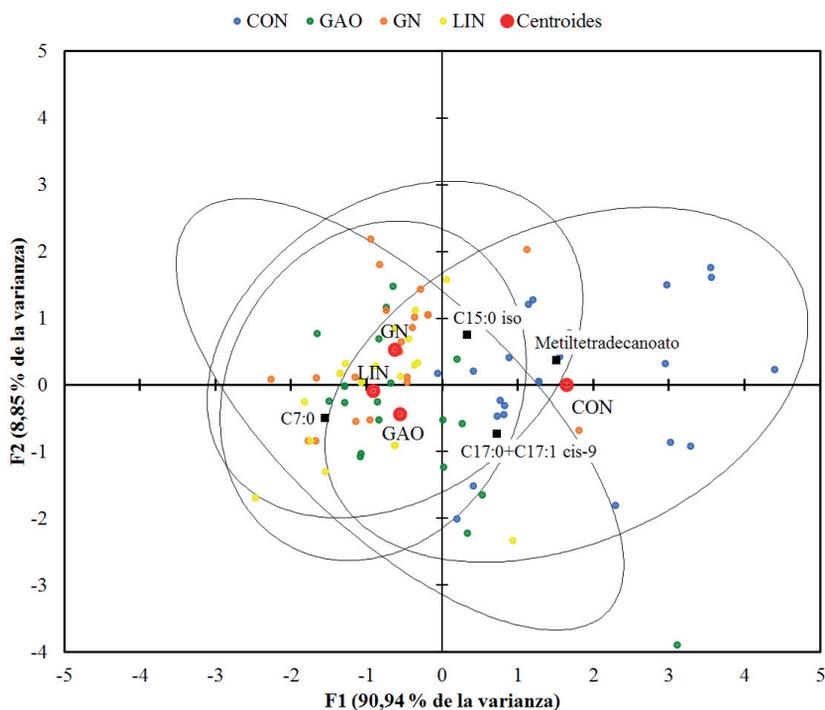


FIGURA 2.1. Gráfico de las puntuaciones discriminantes de las observaciones individuales para cada uno de los tratamientos en las dos primeras funciones canónicas (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino)

La función 2 discriminó débilmente al tratamiento GN del tratamiento GAO (**Tabla 2.2, Figura 2.1**). La mayor capacidad discriminante se debió a C15:0 iso en sentido positivo y a la suma C17:0+C17:1 *cis*-9 en sentido negativo. Algunas especies de bacterias ruminales con actividad amilolítica (*Succinomonas amylolytica*, *Prevotella* spp.) son especialmente ricas en C15:0 iso (Vlaeminck *et al.*, 2006; Fievez *et al.*, 2012). Por tanto, el poder discriminatorio de C15:0 iso a favor del tratamiento GN indicaría que dicho tratamiento modificó el ambiente ruminal favoreciendo un mayor crecimiento de las poblaciones microbianas mencionadas más arriba frente a otras especies tanto amilolíticas como celulolíticas.

TABLA 2.3. Funciones discriminantes de Fisher y tasas de acierto con la matriz original y tras la validación cruzada (CON, ración basal sin aceite añadido; GAO, ración con aceite de girasol alto oleico; GN, ración con aceite de girasol normal; LIN, ración con aceite de lino).

	CON	GAO	GN	LIN
Constante	-51,6	-36,2	-36,7	-34,1
C7:0	-407,6	-200,0	-221,9	-177,9
Metiltetradecanoato	320,1	154,7	167,7	141,5
C15:0 iso	408,3	348,3	388,7	353,8
C17:0 + C17:1 <i>cis</i> -9	69,5	55,9	47,5	49,8
Tasa de acierto con la matriz original				
CON	82,1	10,7	7,1	0,0
GAO	4,5	36,4	22,7	36,4
GN	9,1	0	54,5	36,4
LIN	4,5	9,1	27,3	59,1
Tasa de acierto con validación cruzada				
CON	82,1	10,7	7,1	0,0
GAO	4,5	31,8	22,7	40,9
GN	9,1	4,5	50,0	36,4
LIN	4,5	18,2	36,4	40,9

Las funciones discriminantes de Fisher y la tasa de acierto en la clasificación de las observaciones se muestran en la **Tabla 2.3**. La tasa de acierto fue muy superior en las observaciones del tratamiento CON que en los tratamientos con aceite. En estos, la mejor tasa de acierto se observó en el

tratamiento GN y la peor en el tratamiento GAO. Las observaciones del tratamiento GAO se confundieron en gran medida con las del tratamiento LIN, y las de este se confundieron principalmente con las del tratamiento GN. El porcentaje de acierto global en la validación cruzada (53,2%) fue inferior a los encontrados en los estudios de Gaspardo *et al.* (2010) y Martínez Marín *et al.* (2012a) (100% y 98,9%, respectivamente), pero en dichos trabajos no se investigó la habilidad discriminante de un grupo específico de ácidos grasos de la grasa láctea. En el presente trabajo, las variables predictoras se seleccionaron únicamente entre los OBCFA. En el trabajo de Gaspardo *et al.* (2010) todos los ácidos grasos identificados (un total de 53) se utilizaron como variables predictoras, mientras que en el trabajo de Martínez Marín *et al.* (2012a) se seleccionaron hasta 20 variables predictoras de los 82 ácidos grasos identificados en total.

CONCLUSIONES

Se comprobó que el análisis discriminante lineal permitió separar de forma acertada las muestras de grasa láctea de cabras que consumieron raciones sin aceite de las de aquellas cuya ración incluyó aceites vegetales, a partir de los contenidos de tan solo cuatro OBCFA (C7:0, metiltetradecanoato, C15:0 iso y la suma de C17:0+C17:1 *cis*-9), identificados y cuantificados por cromatografía gaseosa. Sin embargo, la clasificación de las muestras de grasa láctea de acuerdo con el grado de insaturación de los aceites suministrados a los animales tuvo una baja tasa de aciertos. Los OBCFA de la grasa láctea fueron mejores indicadores de la presencia de aceite vegetal en la ración que del tipo de suplemento lipídico incluido en la misma.

Capítulo 3

EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DERIVADOS DEL METABOLISMO MICROBIANO RUMINAL TRAS LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE LINO EN LA DIETA DE CABRAS LECHERAS



RESUMEN

La incorporación de suplementos lipídicos ricos en el ácido α -linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3), como el lino o la camelina, en la dieta de animales rumiantes en lactación se ha perfilado como una estrategia nutricional muy efectiva para aumentar los contenidos de ácidos grasos omega-3 en la grasa de leche (Gómez-Cortés *et al.*, 2009; Martínez-Marín *et al.*, 2012; Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto que estos suplementos pueden desencadenar tanto en el medioambiente ruminal como en el metabolismo lipídico, no es tan conocido y merece un estudio en profundidad. En este capítulo se evalúa la influencia de la incorporación de aceite de lino (30 g/día) en la dieta de cabras lecheras, comparando a su vez dos tipos de concentrado, uno rico en fibra neutro detergente y otro con alto contenido en almidón. Las cuatro dietas ensayadas se suministraron durante 25 días. Se tomaron muestras de leche al comienzo (Día 1), en la primera semana (Día 7) y al final del período experimental (Día 25) y se investigaron los efectos que los distintos tratamientos ejercían sobre los ácidos grasos derivados del metabolismo microbiano ruminal, principalmente ácidos grasos de cadena impar, ramificada y ácidos grasos *trans*. La alimentación con un concentrado rico en fibra neutro detergente mostró los contenidos más elevados de los ácidos grasos 15:0, 14:0 *iso* y 16:0 *iso* en leche, que disminuyeron significativamente cuando ese mismo concentrado se suplementó con aceite de lino. En contraste, el concentrado rico en almidón presentó niveles más bajos de 15:0, 14:0 *iso* y 16:0 *iso*, y sus porcentajes no variaron cuando se adicionó el aceite. Respecto a los ácidos grasos *trans*, sus niveles aumentaron significativamente en los tratamientos que incluyeron aceite de lino en su composición, pero no se observaron diferencias según la composición del concentrado. En el presente trabajo se detalla la evolución temporal de estos ácidos grasos minoritarios relacionados con el metabolismo microbiano y se discute la presencia de los mismos en la grasa láctea, fruto del proceso de biohidrogenación ruminal del ácido α -linolénico.



INTRODUCCIÓN

Los mamíferos son capaces de sintetizar todos los ácidos grasos necesarios para un buen funcionamiento de su organismo con excepción de los ácidos grasos de las familias omega-6 y omega-3, que deben suministrarse en la dieta y por ello se consideran esenciales. Si nos centramos en los animales rumiantes, los piensos más utilizados por las explotaciones ganaderas suelen contener cantidades destacables de ácidos grasos omega-6, mientras que la presencia de ácidos grasos omega-3 a menudo es muy limitada. Los ácidos grasos omega-3 están involucrados en diversos procesos biológicos y su suplementación dietética es de especial interés en ganado lechero. La ingesta de ácidos grasos omega-3 ha mostrado efectos beneficiosos tanto en el sistema reproductor como en el sistema inmunológico del ganado (Moallem, 2018). De especial interés para la nutrición humana son los efectos en el perfil lipídico de la leche, ya que la suplementación con ácidos grasos omega-3 no sólo aumenta el contenido de los mismos en los productos derivados de rumiantes, sino que también reduce los niveles de ácidos grasos saturados y la relación omega-6:omega-3 en la grasa láctea (Bernard *et al.*, 2018).

Durante décadas, los ganaderos han suministrado suplementos lipídicos al ganado para mejorar el rendimiento lechero y modular el perfil de ácidos grasos de la leche (Givens and Shingfield, 2006). En general, existen dos fuentes principales de ácidos grasos omega-3 en la dieta de animales rumiantes. Por un lado, están aquellos suplementos de origen vegetal, como el aceite de lino o la camelina, que se caracterizan por presentar niveles destacados de ácido α -linolénico (18:3 omega-3) y, por otro lado, los suplementos de origen marino como el aceite de pescado y las microalgas, que son una buena fuente de los ácidos grasos eicosaenoico (20:5 omega-3) y docosahexaenoico (22:6 omega-3). Investigaciones previas han señalado que los suplementos de origen marino pueden suprimir la ingesta de alimento en animales rumiantes cuando se suministran en niveles por encima del 1% de materia seca (AbuGhazaleh *et al.*, 2002 Whitlock *et al.*, 2002). Sin embargo, esto no ocurriría con los aceites y semillas de origen vegetal y, por ello, han sido más ampliamente utilizados en granjas de explotación.

Una vez que los lípidos entran en el tracto digestivo de los animales rumiantes están sometidos a dos transformaciones microbianas en la cavidad ruminal, el proceso de lipólisis y la biohidrogenación. En la lipólisis, los triglicéridos de la dieta son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por la acción de las enzimas lipasas presentes en las bacterias ruminales. Si los lípidos no están protegidos, como en el caso de la suplementación con aceites, este proceso es muy rápido y la extensión en la que se produce la lipólisis es muy elevada, llegándose a hidrolizar entre un (85-95)% de la cantidad de aceite suministrado y con una acumulación mínima de moléculas de mono- y di-glicéridos (Bauchart *et al.*, 1990). El glicerol resultante de la lipólisis sufre un proceso de fermentación, generando ácidos grasos volátiles que son absorbidos a través de la pared ruminal y pueden ser utilizados como precursores en la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena corta y media en la glándula mamaria (Doreau y Ferlay, 1994). Por otra parte, los ácidos grasos libres presentes en el rumen son sometidos a un proceso de biohidrogenación en el que los dobles enlaces de sus moléculas son hidrogenados por las bacterias hasta convertirse en ácidos grasos saturados. Existe la idea generalizada de que la biohidrogenación ocurre para proteger a la microbiota ruminal de posibles efectos tóxicos que los ácidos grasos insaturados podrían ejercer, ya que se ha demostrado que la toxicidad de los ácidos grasos saturados es menor que la de los insaturados para los microorganismos (Vargas-Bello-Pérez y Garnsworthy, 2013).

La extensión del proceso de biohidrogenación ruminal depende de diversas variables, entre las que destaca la relación forraje:concentrado de las raciones (Kucuk *et al.*, 2001), la forma física en la que se presentan los suplementos lipídicos (Whitlock *et al.*, 2002), y la cantidad de grasa adicionada en la dieta (Shingfield *et al.*, 2003). Otros factores como la cantidad de almidón ingerido por los animales han sido menos evaluados, pero podrían también tener un efecto destacado en este complejo entramado que es la biohidrogenación ruminal. Por otra parte, se ha estudiado que los suplementos de origen marino evitan la biohidrogenación completa de los ácidos grasos poli-insaturados y, en consecuencia, se reduce la producción de ácido esteárico (18:0) y se acumulan ácidos grasos monoinsaturados en el rumen. Este fenómeno estaría originado por cambios en la población microbiana y una disminución del pH en el rumen (Loor *et al.*, 2005a y 2005b).

La biohidrogenación ruminal de los lípidos de la dieta suele ser incompleta. Un amplio espectro de productos de biohidrogenación, en su mayoría ácidos grasos *cis* y *trans* mono- y poli-insaturados, alcanzan el duodeno y, después de ser absorbidos, se acumulan en los distintos tejidos del animal rumiante y en la grasa de leche (Shingfield *et al.*, 2013).

La manipulación del metabolismo lipídico en rumiantes supone al mismo tiempo un desafío y una oportunidad para mejorar el perfil lipídico de los pro-

ductos alimenticios que derivan de estos animales, principalmente leche, carne y productos lácteos (Scollan *et al.*, 2014).

La leche y los productos lácteos se encuentran entre los alimentos más utilizados en la dieta humana moderna. Mediante la incorporación de aceite o semilla de lino en las raciones de ganado vacuno, los niveles de ácidos grasos omega-3 en la grasa de leche pueden modificarse desde (0.2 – 0.5) g / 100 g de ácidos grasos totales, que serían los niveles convencionales, a alcanzar contenidos comprendidos entre (1.0 - 1.8) g / 100 g si el ganado consume el suplemento rico en ácido α -linolénico (Moallem, 2018). Además del aumento de los ácidos grasos omega-3, de forma directa se produce una disminución de la relación omega-6:omega-3, que sería muy positiva desde el punto de vista nutricional de la grasa láctea.

En las sociedades occidentales, el consumo de ácidos grasos omega-6 ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. La proporción omega-6:omega-3 en nuestra alimentación ha variado desde valores en torno a la unidad antes de 1960, a superar el rango (15 - 20) en las dietas occidentales modernas. Es importante señalar que el desajuste en la relación omega-6:omega-3 se ha señalado como el origen de muchas de las enfermedades crónicas que afectan a las sociedades industrializadas (Simopoulos, 2008) y muchos expertos apuntan a la necesidad de reducir esta relación en los alimentos que consumimos. Aproximadamente el 35% de las calorías diarias totales que consume un humano adulto provienen de la grasa. Si el 50% del consumo diario de grasa procede de productos lácteos, un humano adulto consumiría ~ 40 g de grasa de dicha fuente. El enriquecimiento de la grasa láctea con ~ 1.2 g de ácido α -linolénico / 100 g de ácidos grasos totales, significaría que la ingesta humana de ácidos grasos omega-3 aumentaría alrededor de 0.5 g / día (Moallem, 2018). Estos aumentos irían acompañados de una reducción del contenido de ácidos grasos saturados y la disminución de la relación omega-6:omega-3 en la dieta por lo que, en comparación con el consumo de grasas lácteas convencionales, la ingesta de grasa de leche enriquecida de forma natural en ácidos grasos omega-3 sería muy recomendable para la salud humana.

A pesar del auge de la suplementación de la dieta de animales rumiantes con suplementos ricos en ácidos grasos omega-3, existe poca información en la literatura que describa los efectos que estos suplementos originan en el medioambiente ruminal y en ciertos ácidos grasos minoritarios que encontramos en la grasa láctea y que proceden del metabolismo microbiano. Estos efectos no sólo están motivados por la suplementación lipídica sino también por la dieta base que consumen los animales. El presente estudio compara la suplementación de la dieta de cabras lecheras con 30 g al día de aceite de lino en dos concentrados experimentales diferentes, uno rico en fibra neutro detergente y otro con un alto contenido de almidón. Se examinaron en detalle los efectos que estas

dietas tuvieron en el perfil de la grasa láctea, prestando especial atención a los ácidos grasos derivados del metabolismo microbiano ruminal, principalmente ácidos grasos de cadena impar, ramificada y ácidos grasos *trans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y DIETAS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba, siguiendo las especificaciones de la normativa española de protección de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia).

Se utilizaron 16 cabras de raza Malagueña con un peso vivo inicial de 52.9 ± 3.7 kg. Todos los animales se encontraban en su segunda o tercera lactación (118 ± 16 días de lactación). Las cabras se seleccionaron de una granja comercial y se agruparon, antes de comenzar el experimento, en grupos de 4 cabras cada una atendiendo su peso vivo y producción de leche. Se alojaron en jaulas de 1,0 x 1,4 m, con suelo permeable a los excrementos y dotadas de comederos y bebederos independientes. Finalmente, los grupos se asignaron de forma aleatoria a cada uno de los cuatro tratamientos experimentales que están descritos en la Tabla 3.1.

Las cuatro raciones presentaron la misma dieta basal, que consistía en heno de alfalfa y un concentrado granulado en una proporción 33:67. Los concentrados experimentales se elaboraron antes de comenzar el estudio en las instalaciones de la empresa Iniciativas Alimentarias S.A. (Torralba de Calatrava, Ciudad Real).

El concentrado rico en almidón se preparó a base de cebada, maíz y harina de soja mientras que en el concentrado rico en fibra neutro detergente, se reemplazó el 50% de los contenidos de cebada y maíz molido por cascarilla de soja. La relación almidón:fibra neutro detergente fue de 3,1 para el concentrado rico en almidón y 0,8 para el concentrado rico en fibra. Dado que la relación forraje:concentrado no se modificó en los diferentes tratamientos experimentales, se puede confirmar que la mayor parte de la fibra neutro detergente en las dietas no está influenciada por el tipo de forraje empleado.

Tabla 3.1. Ingredientes, composición química y valor nutritivo de las 4 dietas experimentales ensayadas.

	Fibra	Fibra + Lino	Almidón	Almidón + Lino
Ración, g/d				
Heno de alfalfa	600	600	600	600
Concentrado	1200	1200	1200	1200
Aceite de lino	-	30	-	30
Ingredientes, g/kg peso seco al aire				
Maíz molido	178,0	173,7	356,0	347,5
Cebada molida	178,0	173,7	356,0	347,5
Cascarilla de soja	356,0	347,6	0,0	0,0
Harina de soja molida	250,0	244,0	250,0	244,0
Aceite de lino	0,0	24,4	0,0	24,4
Corrector vitamínico-mineral	30,0	29,3	30,0	29,3
Aglomerante	7,0	6,8	7,0	6,8
Antioxidante	1,0	1,0	1,0	1,0
Composición química				
Materia seca (MS), %	89,5	90,0	89,2	89,7
Cenizas, % MS	7,3	7,2	7,0	6,8
Proteína bruta, % MS	18,1	18,0	18,2	17,8
Fibra neutro detergente, % MS	40,7	40,4	27,5	27,7
Carbohidratos no fibrosos, %MS	31,8	30,6	44,4	43,3
Almidón, % MS	19,7	18,3	33,6	32,1
Grasa hidrólisis ácida, % MS	2,1	3,9	2,9	4,4
Valor nutritivo				
ENI, MJ/kg	5,83	6,05	5,97	6,19
PDIA, g/kg	60	59	59	58
PDIE, g/kg	117	115	114	112
PDIN, g/kg	106	104	103	102

Los otros dos tratamientos experimentales (Fibra + Lino y Almidón + Lino) consistían en el mismo concentrado (Fibra y Almidón) al que se le adicionó 30 g de aceite de lino. El perfil de ácidos grasos del aceite de lino utilizado se muestra en la Tabla 3.2. El aceite de lino contenía más de 45 g de ácido α -linolénico / 100 g de ácidos grasos totales y una relación omega-6:omega-3 inferior a 1. El aceite se añadió de forma manual a los concentrados experimentales, mezclado en una proporción 1:10 con la harina de soja molida, para facilitar una distribución homogénea en la mezcladora.

TABLA 3.2. Perfil de ácidos grasos del aceite de lino incorporado en las raciones (g/100 g de ácidos grasos totales).

Ácido graso	
14:0	0,05
15:0	0,03
16:0	5,49
17:0	0,07
<i>cis</i> -9 16:1	0,08
18:0	4,10
<i>cis</i> -9 18:1	17,49
<i>cis</i> -11 18:1	0,71
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	15,62
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -15 18:3	0,42
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -15 18:3	3,66
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	0,59
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	3,08
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3	46,59
Otros	2,02
Σ Ácidos grasos saturados	9,74
Σ Ácidos grasos insaturados	88,24
Σ omega-6	15,62
Σ omega-3	54,34
Relación omega-6:omega-3	0,29

Las dietas experimentales se prepararon diariamente y se ofrecieron a los animales en 2 tomas iguales, a las 9:30 h y a las 17:30 h. Las cabras tenían acceso a agua *ad libitum*. El ordeño se llevó a cabo de forma individual, una vez al día, con un sistema de ordeño mecánico portátil (DeLaval, Madrid).

Se tomaron muestras individuales de cada una de las cabras en lactación al comienzo del experimento (Día 1), en la primera semana (Día 7) y al final del período experimental (Día 25). Las muestras se guardaron a -20 °C hasta que fueron atemperadas para ser analizadas en el laboratorio.

EXTRACCIÓN DE LA GRASA DE LECHE, DERIVATIZACIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La extracción de la fracción lipídica de las muestras de leche de cabra se llevó a cabo según el método descrito por Luna *et al.*, 2005, que consiste en un proceso de doble centrifugación. La primera centrifugación se realiza a temperatura ambiente durante 30 min para separar la nata del resto de componentes de la leche. A continuación, la nata se recoge en microtubos de centrífuga de 2 mL que se centrifugan de nuevo en frío (0°C) durante 20 min para separar la grasa. El extracto lipídico se recoge en viales ámbar y, tras aplicarse una corriente de nitrógeno para evitar procesos oxidativos en el espacio de cabeza, se almacenan a -20°C hasta llevar a cabo la derivatización.

El procedimiento de derivatización consistió en una metanólisis básica de los triacilglicérols usando KOH 2N disuelto en metanol (ISO-IDF, 2002). El análisis de los ésteres metílicos se realizó por cromatografía de gases de acuerdo al procedimiento descrito por De la Fuente *et al.* (2015). Se utilizaron dos equipos cromatográficos equipados con columnas capilares complementarias. El primero fue un modelo Agilent 6890 N Network System, (Palo Alto, Estados Unidos) equipado con autoinyector, detector de ionización de llama y una columna capilar polar de sílice fundida CP-Sil 88 (100 m x 0.25 mm de diámetro interno, Varian, Middelburg, Holanda). La temperatura del inyector y del detector fueron de 250°C. El Helio fue el gas portador con una presión en cabeza de columna de 193 kPa y se utilizó un split 1:100. El horno se mantuvo a 45 °C durante 4 minutos tras la inyección y, a continuación, se programó un aumento de temperatura progresivo de 13°C/min hasta alcanzar 165°C, temperatura que se mantuvo durante 35 minutos. Después se programó una segunda rampa de temperatura a 4°C/min hasta alcanzar 215°C, manteniendo esta temperatura 30 min adicionales. El segundo cromatógrafo (Agilent model 7820 GC System) estaba equipado con una columna capilar con fase estacionaria consistente en un líquido iónico de extrema polaridad, por encima del 100% en la escala de polaridad (SLB-IL111, 100 m x 0.25 mm de diámetro interno, Supelco, Estados Unidos). La temperatura del inyector y del detector fueron de 250°C. El Helio fue el gas portador con una presión en cabeza de columna de 241 kPa y también se utilizó un split 1:100. El horno se mantuvo a 168°C durante 45 minutos tras la inyección y, a continuación, se

programó un aumento de temperatura progresivo de 5°C/min hasta alcanzar 210°C, temperatura que se mantuvo durante 37 minutos adicionales.

La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo por espectrometría de masas utilizando un Agilent modelo 7890A provisto de un detector de masas (5975C inert MSD) que operó con una energía de ionización por impacto electrónico de 70 EV. El resto de condiciones cromatográficas fueron similares a las descritas anteriormente para el análisis con columnas CP-Sil 88 y SLB-IL111, excepto que el split utilizado fue 1:25. Para confirmar las asignaciones, se utilizaron patrones comerciales (Nu-Chek Prep. Inc., Elysian, Estados Unidos) y la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 05).

La cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos individuales se llevó a cabo por comparación con una grasa de leche de referencia de composición certificada por la Comisión Europea (CRM 164; European Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Para obtener el perfil completo de ácidos grasos, se combinaron los resultados de las dos columnas cromatográficas complementarias. Los resultados de la columna CP-Sil 88 se utilizaron como la principal fuente de referencia, mientras que los cromatogramas obtenidos con la columna SLB-IL111 se emplearon para calcular los porcentajes de aquellos ácidos grasos que no podían separarse con la columna CP-Sil 88 de acuerdo con los cálculos que se muestran en la Tabla 3.3.

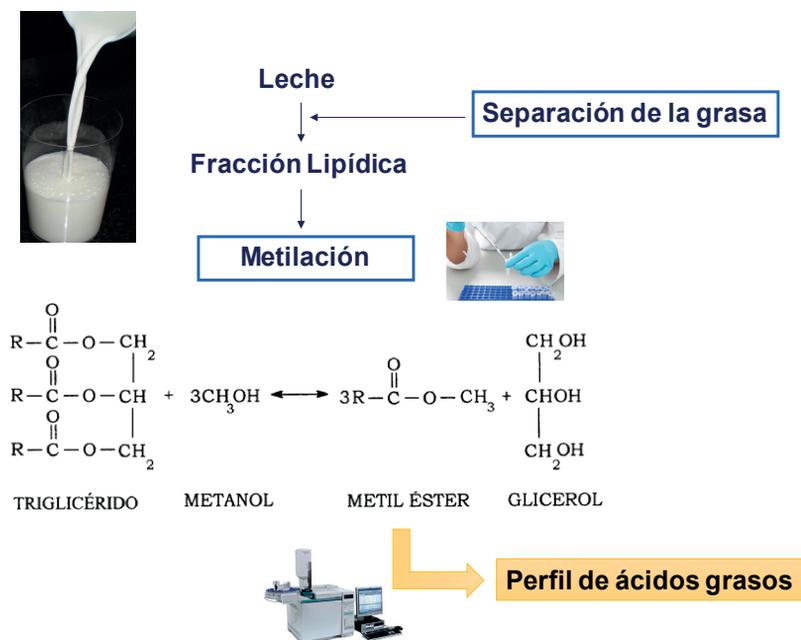


FIGURA 3.1. Esquema del tratamiento de muestra previo a la caracterización de su perfil lipídico.

Tabla 3.3. Listado de ácidos grasos no resueltos con la columna CP-Sil 88 (CP) y posteriormente discriminados con la columna SLB-IL111 (SL).

CP-SIL 88	SLB-IL111	Cálculos
11:0 + 10:1	11:0	$\% 10:1 = [\text{Área } 10:1 \text{ SL X } (\% 10:1 + 11:0 \text{ CP})] / [\text{Área } 10:1 \text{ SL} + \text{Área } 11:0 \text{ SL}]$
	10:1	$\% 11:0 = (\% 11:0 + 10:1 \text{ CP}) - \% 10:1$
13:0 + c11 12:1	13:0	$\% 13:0 = (\% 12:0 \text{ CP} \times \text{Área } 13:0 \text{ SL}) / \text{Área } 12:0 \text{ SL}$
	c11 12:1 + iso 14:0	$\% c11 \ 12:1 = (\% 13:0 + c11 \ 12:1 \text{ CP}) - \% 13:0$
iso 17:0 + t9 16:1	iso 17:0	$\% iso \ 17:0 = (\% 16:0 \text{ CP} \times \text{Área } iso \ 17:0 \text{ SL}) / \text{Área } 16:0 \text{ SL}$
	t9 16:1	$\% t9 \ 16:1 = (\% t9 \ 16:1 + iso \ 17:0 \text{ CP}) - \% iso \ 17:0$
aiso 17:0 + t9 16:1	aiso 17:0 + t9 16:1	$\% t9 \ 16:1 = (\% 16:0 \text{ CP} \times \text{Área } t9 \ 16:1 \text{ SL}) / \text{Área } 16:0 \text{ SL}$
	t9 16:1	$\% aiso \ 17:0 = (\% aiso \ 17:0 + t9 \ 16:1 \text{ CP}) - \% t9 \ 16:1$
	t9/10 18:1	$\% t13 + t14 \ 18:1 = [(\text{Área } t13/14 \text{ SL}) \times (\% 19:0 + \text{Bloque } 18:1 \text{ CP})] / \text{Área Bloque } 18:1 \text{ SL}$
	t13/14 18:1	$\% t9/t10 \ 18:1 = (\% t9/t10 \ 18:1 + t13/14 \ 18:1 \text{ CP}) - \% t13/14 \ 18:1$
	t6 + t7 18:1	$\% t6 + t7 \ 18:1 = [(\text{Área } t6 + t7 \text{ SL}) \times (\% 19:0 + \text{Bloque } 18:1 \text{ CP})] / \text{Área Bloque } 18:1 \text{ SL}$
	t8 + t9 18:1	$\% t8 \ 18:1 = (\% t6 + t7 + t8 \ 18:1 \text{ CP}) - \% t6 + t7 \ 18:1$
	t16 18:1	$\% t16 \ 18:1 = [\text{Área } t16 \ 18:1 \text{ SL} \times (\% t16 \ 18:1 + c14 \ 18:1 \text{ CP})] / \text{Área } t16 \ 18:1 \text{ SL} + \text{Área } c14 \ 18:1 \text{ SL}$
	c14 18:1	$\% c14 \ 18:1 = (\% c14 \ 18:1 + t16 \ 18:1 \text{ CP}) - \% t16 \ 18:1$
	t7 t9 18:2	$\% t7 \ t9 \ 18:2 = [\text{Área } t7 \ t9 \ 18:2 \text{ SL} \times (\% t7 \ t9 \ 18:2 + t9 \ t11 \ 18:2 + 20:2 \text{ CP})] / \text{Área } t7 \ t9 \ 18:2 \text{ SL} + \text{Área } t9 \ t11 + 20:2 \text{ SL}$
	t9 t11 18:2	$\% t9 \ t11 \ 18:2 = (\% t7 \ t9 \ 18:2 + t9 \ t11 \ 18:2 \text{ CP}) - \% t7 \ t9 \ 18:2$
18:3 n-3 + c11 20:1	18:3 n-3	$\% c11 \ 20:1 = [\text{Área } c11 \ 20:1 \text{ SL} \times (\% c11 \ 20:1 + 18:3 \text{ n-3 CP})] / \text{Área } c11 \ 20:1 \text{ SL} + \text{Área } 18:3 \text{ n-3 SL}$
	c11 20:1	$\% 18:3 \text{ n-3} = (\% 18:3 \text{ n-3} + c11 \ 20:1 \text{ CP}) - \% c11 \ 20:1$
	t11c15 18:2	$\% t10c15 \ 18:2 = (\% t9 \ t12 \ 18:2 \text{ CP} \times \text{Área } t10c15 \ 18:2 \text{ SL}) / \text{Área } t9 \ t12 \ 18:2 \text{ SL}$
t11c15 18:2 + t10c15 18:2	t10c15 18:2	$\% t11c15 \ 18:2 = (\% t11c15 + t10c15 \text{ CP}) - \% t10c15 \ 18:2$

Datos tomados de De la Fuente *et al.* (2015). *aiso* = *anteiso*; *c* = *cis*; *t* = *trans*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SAS University Edition 3.5 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Se utilizó el procedimiento MIXED para el análisis de medidas repetidas en el tiempo en cada uno de los ácidos grasos individuales presentes en la grasa de leche (Littell *et al.*, 2002). El modelo estadístico incluyó el valor a día 0 como covariable, el efecto fijo del tratamiento, día y su interacción, así como el efecto aleatorio del animal anidado al tratamiento. Se asumió una estructura de simetría compuesta sobre la base de los criterios de ajuste del modelo de información bayesiano de Schwarz. Las medias de mínimos cuadrados (ajustadas por la covarianza) de la interacción tratamiento x tiempo se compararon mediante la opción CONTRAST del procedimiento MIXED. El nivel de significación quedó establecido en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ÁCIDOS GRASOS IMPARES Y RAMIFICADOS

La Tabla 3.4 muestra un total de 8 ácidos grasos de cadena impar y / o ramificada detectados en grasa de leche de cabras alimentadas con los 4 tratamientos experimentales ensayados. En términos generales, la grasa láctea presentó alrededor de un 2 % del total de ácidos grasos en forma de ácidos grasos ramificados (*iso* y *anteiso*) y aproximadamente un 1.5 % en forma de ácidos grasos impares, siendo los más abundantes 15:0, 17:0 y sus análogos metil-ramificados.

La evolución temporal de los ácidos grasos impares y ramificados no siguió un único patrón, y se observaron distintas evoluciones según el ácido graso y la dieta experimental seleccionada. Los mayores cambios se detectaron en la ración que incluía un concentrado rico en fibra neutro detergente, con aumentos significativos en los ácidos grasos *iso* 14:0, 15:0, *anteiso* 15:0, *iso* 16:0 y *anteiso* 17:0 desde el inicio (Día 1) al final del tratamiento (Día 25). Los niveles de *iso* 14:0, 15:0 y *iso* 15:0 en grasa láctea también se incrementaron cuando el concentrado rico en fibra se mezcló con aceite de lino. Por su parte, el concentrado rico en almidón provocó variaciones significativas en los ácidos grasos 15:0, *iso* 17:0 y *anteiso* 17:0, entre los que destaca una caída en los niveles de *anteiso* 17:0 tras 7 días de suplementación con aceite de lino.

Es bien conocido que la mayor parte de los ácidos grasos de cadena impar y ramificada que se encuentran en la grasa láctea proceden de la fermentación ruminal y, por ello, estos compuestos se han utilizado como biomarcadores no invasivos de la actividad microbiana del rumen (Goetsch, 2019). De hecho, se ha demostrado que variaciones en los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados pueden reflejar cambios en las poblaciones bacterianas del rumen y alteraciones inducidas por la composición de la dieta de los animales. Por ejemplo, Cívico *et al.* (2017) utilizaron de manera efectiva las concentraciones de los ácidos grasos de cadena impar y ramificada en leche de cabra para diferenciar diversas dietas experimentales suplementadas o no con aceite de lino. En otro estudio reciente, también llevado a cabo en leches de ganado caprino, se observaron niveles más bajos de ácidos grasos impares y ramificados cuando la dieta de los animales era suplementada con aceite de palma hidrogenado o aceite de colza (Inglingstad *et al.*, 2017). Estos autores señalaron que la inclusión de aceites en las raciones de los animales rumiantes podría generar efectos adversos en la actividad microbiana ruminal, disminuyendo la síntesis *de novo* y ocasionando cambios en el perfil de los ácidos grasos impares y ramificados que finalmente se incorporan a la grasa láctea.

Como se expuso en la introducción, las bacterias celulolíticas tienen la capacidad de producir celulasas, enzimas que pueden hidrolizar la celulosa, y que se caracterizan por rendir mayores contenidos de ácidos grasos ramificados *iso*. En contraste, las bacterias amilolíticas son digestoras de almidón y suelen mostrar niveles superiores de ácidos grasos impares y contenidos más limitados de ácidos grasos de cadena ramificada (Vlaeminck *et al.*, 2006). En la Figura 2 se muestran los contenidos en grasa de leche de los ácidos grasos *iso* 14:0 e *iso* 16:0 al final del período experimental (Día 25). Los niveles más altos de ambos ácidos grasos se detectaron en cabras alimentadas con el concentrado rico en fibra neutro detergente, y se observaron aumentos significativos en grasa láctea desde la primera semana de tratamiento (Día 7, Tabla 4). Estos cambios podrían estar relacionados con un crecimiento poblacional de las bacterias celulolíticas que habitan el rumen, como resultado de los mayores niveles de fibra en las raciones. Por otro lado, el grupo de cabras que consumió el concentrado rico en fibra y suplementado con aceite de lino mostró contenidos significativamente menores de *iso* 14:0 e *iso* 16:0 (Figura 2), lo que podría sugerir que la incorporación de un suplemento lipídico en dietas con un contenido alto de fibra neutro detergente podría también desencadenar cambios en la microbiota ruminal.

TABLA 3.4. Contenidos (g /100 g de ácidos grasos totales) de ácidos grasos impares y ramificados en grasa láctea de cabras alimentadas con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.

Ácido graso	Tratamiento (T)	Día (D)			EEM
		1	7	25	
<i>iso</i> 14:0	Fibra	0,046B	0,081Aa	0,076Aa	0,0028
	Fibra + Lino	0,039B	0,063Ab	0,058Ab	
	Almidón	0,043	0,053b	0,036c	
	Almidón + Lino	0,041	0,043b	0,038c	
15:0	Fibra	0,541B	0,842Ba	0,871Aa	0,0219
	Fibra + Lino	0,487B	0,715Aab	0,670Ab	
	Almidón	0,562	0,676b	0,644b	
	Almidón + Lino	0,539B	0,699Aab	0,741Aab	
<i>iso</i> 15:0	Fibra	0,165	0,195	0,176	0,0058
	Fibra + Lino	0,131B	0,178A	0,163AB	
	Almidón	0,146	0,165	0,135	
	Almidón + Lino	0,132	0,152	0,155	
<i>anteiso</i> 15:0	Fibra	0,203B	0,301A	0,330A	0,0101
	Fibra + Lino	0,169	0,234	0,237	
	Almidón	0,208	0,249	0,229	
	Almidón + Lino	0,195	0,249	0,238	
<i>iso</i> 16:0	Fibra	0,146B	0,218A	0,193Aa	0,0062
	Fibra + Lino	0,150	0,179	0,171b	
	Almidón	0,134	0,162	0,153b	
	Almidón + Lino	0,171	0,165	0,158b	
17:0 + <i>cis</i> -9 17:1	Fibra	0,796	0,809	0,786	0,0164
	Fibra + Lino	0,729	0,697	0,712	
	Almidón	0,696	0,761	0,680	
	Almidón + Lino	0,670	0,649	0,709	
<i>iso</i> 17:0	Fibra	0,276	0,316ab	0,273	0,0067
	Fibra + Lino	0,275	0,300ab	0,258	
	Almidón	0,248B	0,323Aa	0,243B	
	Almidón + Lino	0,242	0,256b	0,214	
<i>anteiso</i> 17:0	Fibra	0,237B	0,245B	0,307A	0,0102
	Fibra + Lino	0,243	0,201	0,248	
	Almidón	0,277	0,262	0,269	
	Almidón + Lino	0,234A	0,148B	0,286A	

EEM = error estándar de la media.

A,B,C Para cada ácido graso, dentro de cada tratamiento, las medias de mínimos cuadrados sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05) entre días de muestreo.

a,b,c Para cada ácido graso, dentro de cada día de muestreo, las medias de mínimos cuadrados sin un superíndice común son significativamente diferentes (P<0,05) entre tratamientos.

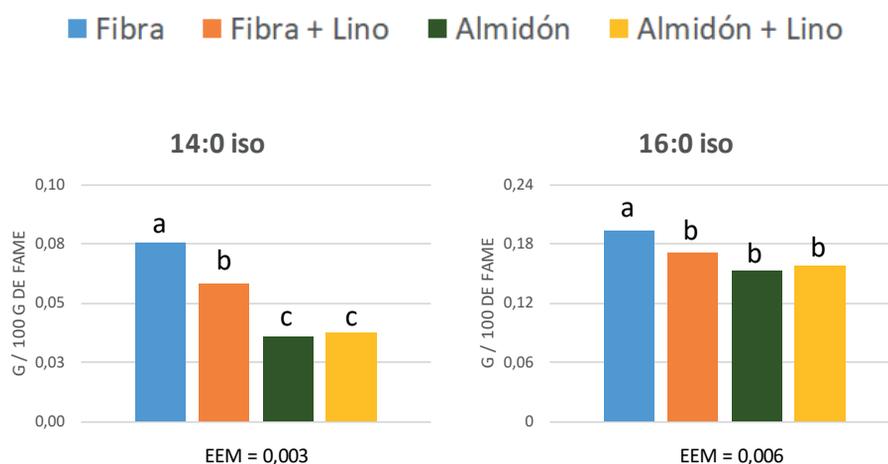


FIGURA 3.2. Contenido de los ácidos grasos *iso* 14:0 e *iso* 16:0 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.

* a,b,c indican medias significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tratamientos. EEM = error estándar de la media.

Los ácidos grasos *iso* 14:0 e *iso* 16:0 presentaron sus niveles más bajos en leche de cabras que consumieron el concentrado rico en almidón (Figura 2). A diferencia del concentrado rico en fibra neutro detergente, no se observaron cambios significativos cuando el concentrado rico en almidón se mezcló con aceite de lino (Tabla 4). Esto pone de manifiesto que el aceite de lino ejercería un efecto más determinante sobre la proliferación de bacterias celulolíticas en comparación con las amilolíticas, del mismo modo que ocurre en ganado vacuno (Yang *et al.*, 2009). La degradación de sustratos fácilmente fermentables, como el almidón y azúcares simples, puede desencadenar cambios importantes en el medioambiente ruminal. Ello se debe, principalmente, a una disminución del pH y un aumento de los ácidos grasos volátiles y los niveles de ácido láctico en el rumen, que pueden llegar a ocasionar acidosis metabólica en el animal (Sun *et al.*, 2009). La existencia de una relación entre los niveles de *iso* 14:0 en grasa láctea y el pH ruminal se ha confirmado en ganado vacuno (Fievez *et al.*, 2012; Baumann *et al.*, 2016). Por tanto, existe la posibilidad de que cabras alimentadas con el concentrado rico en almidón presenten un pH ruminal más bajo que aquellas que consumieron el concentrado rico en fibra neutro detergente, lo que favorecería una mayor abundancia relativa de bacterias amilolíticas en la cavidad ruminal.

Ácidos grasos *TRANS*

La grasa láctea contiene ácidos grasos *trans* de diversa estructura. Presenta ácidos grasos *trans* monoinsaturados, principalmente 18:1, y poli-insaturados, cuyos dobles enlaces pueden estar conjugados, no-conjugados y, en el caso de contener 3 o más dobles enlaces, también parcialmente conjugados. El perfil de ácidos grasos *trans* de la leche de rumiante está condicionado por los lípidos presentes en la dieta de los animales. Los ácidos grasos *trans* se producen de forma natural en el rumen durante el proceso de biohidrogenación, a partir de los ácidos grasos insaturados de las raciones, principalmente oleico (*cis*-9 18:1), linoleico (*cis*-9 *cis*-12 18:2) y α -linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3). Como resultado de una biohidrogenación incompleta de estos ácidos grasos insaturados se obtiene una amplia gama de isómeros posicionales y geométricos que, una vez abandonan el rumen, se incorporan al torrente sanguíneo y, finalmente, son detectados en la grasa de leche (Kuhnt *et al.*, 2016).

Los factores dietéticos que más influyen en el perfil de los ácidos grasos *trans* en la grasa láctea de rumiante son:

1. dietas que proporcionan altos contenidos de los ácidos grasos linoleico y α -linolénico, precursores mayoritarios del metabolismo lipídico ruminal.
2. raciones capaces de provocar cambios en el medioambiente ruminal y/o en su actividad microbiana.

Es importante destacar que dietas con una baja relación forraje:concentrado, altos contenidos de almidón y/o una suplementación lipídica excesiva, pueden alterar las rutas de biohidrogenación ruminal y, en consecuencia, inducir cambios en el perfil de ácidos grasos *trans* de la leche (Bernard *et al.*, 2018). Para estudiar estos factores en profundidad, se llevó a cabo un análisis exhaustivo por cromatografía de gases del perfil *trans* de la grasa láctea procedente de cabras alimentadas con las 4 raciones ensayadas (Fibra, Fibra + Lino, Almidón y Almidón + Lino) durante todo el período experimental (Día 1, Día 7 y Día 25, Tabla 5). En los análisis se utilizaron dos columnas capilares complementarias (CP-Sil88 y SLB-111) y se prestó especial atención a los intermediarios de biohidrogenación del ácido α -linolénico, por ser el ácido graso mayoritario presente en el aceite de lino.

TABLA 3.5. Contenidos (g / 100 g de ácidos grasos totales) de ácidos grasos *trans* en grasa láctea de cabras alimentadas con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.

Ácido graso	Tratamiento (T)	Día (D)			EEM
		1	7	25	
<i>trans</i> -9 18:1	Fibra	0,191	0,182	0,207b	0,0094
	Fibra + Lino	0,228B	0,242B	0,321Aa	
	Almidón	0,216	0,201	0,241b	
	Almidón + Lino	0,202B	0,260B	0,330Aa	
<i>trans</i> -10 18:1	Fibra	0,178	0,187	0,328b	0,0312
	Fibra + Lino	0,228	0,239	0,346b	
	Almidón	0,214B	0,266B	0,616Aa	
	Almidón + Lino	0,274	0,396	0,416b	
<i>trans</i> -11 18:1	Fibra	0,795	0,815b	1,320b	0,1417
	Fibra + Lino	0,981C	2,014Ba	3,254Aa	
	Almidón	1,235	1,115b	1,789b	
	Almidón + Lino	0,906C	2,100Ba	3,098Aa	
<i>trans</i> -10 <i>cis</i> -15 18:2	Fibra	0,006	0,014b	0,011b	0,0031
	Fibra + Lino	0,026B	0,046Aa	0,046Aa	
	Almidón	0,007	0,010b	0,015b	
	Almidón + Lino	0,025B	0,024Bb	0,043Aa	
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	Fibra	0,025	0,054b	0,070b	0,0360
	Fibra + Lino	0,111B	0,501Aa	0,651Aa	
	Almidón	0,040	0,025b	0,100b	
	Almidón + Lino	0,071B	0,337Aa	0,449Aa	
<i>trans</i> -7 <i>cis</i> -9 18:2	Fibra	0,041	0,042	0,039	0,0017
	Fibra + Lino	0,044	0,044	0,054	
	Almidón	0,050	0,040	0,053	
	Almidón + Lino	0,047	0,059	0,052	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2	Fibra	0,402	0,610b	0,657b	0,0669
	Fibra + Lino	0,512B	1,192Aa	1,450Aa	
	Almidón	0,579	0,659b	0,844b	
	Almidón + Lino	0,419B	1,293Aa	1,384Aa	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 <i>trans</i> -15 18:3	Fibra	0,017B	0,028Aa	0,021Aa	0,0007
	Fibra + Lino	0,018	0,016bc	0,014b	
	Almidón	0,014B	0,020Ab	0,014Bb	
	Almidón + Lino	0,013	0,014c	0,013b	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:3	Fibra	0,040	0,047b	0,041b	0,0036
	Fibra + Lino	0,042B	0,078Aa	0,079Aa	
	Almidón	0,043	0,040b	0,045b	
	Almidón + Lino	0,039B	0,074Aa	0,069Aa	

EEM = error estándar de la media

A,B,C Para cada ácido graso, dentro de cada tratamiento, las medias de mínimos cuadrados sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre días de muestreo.

a,b,c Para cada ácido graso, dentro de cada día de muestreo, las medias de mínimos cuadrados sin un superíndice común son significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tratamientos.

En términos generales, los cambios más destacados en el perfil de ácidos grasos *trans* se observaron con las dietas suplementadas con 30 g/día de aceite de lino, mientras que los efectos derivados de la composición del concentrado fueron más limitados.

A lo largo de todo el período experimental, el ácido graso *trans* monoinsaturado más abundante en la grasa láctea analizada fue el ácido vacénico (*trans*-11 18:1, Tabla 5). Sus contenidos fueron siempre superiores en la leche de cabras cuyas dietas estaban suplementadas con el aceite de lino (Fibra + Lino y Almidón + Lino), sin observarse diferencias significativas entre los dos tipos de concentrado (Figura 3). Como se expuso en la introducción, el ácido vacénico es el precursor fisiológico del ácido ruménico (*cis*-9 *trans*-11 18:2) y, en consecuencia, ambos ácidos grasos mostraron una estrecha correlación (Figura 3.4) y una evolución temporal análoga en las 4 dietas ensayadas (Figura 3.3).

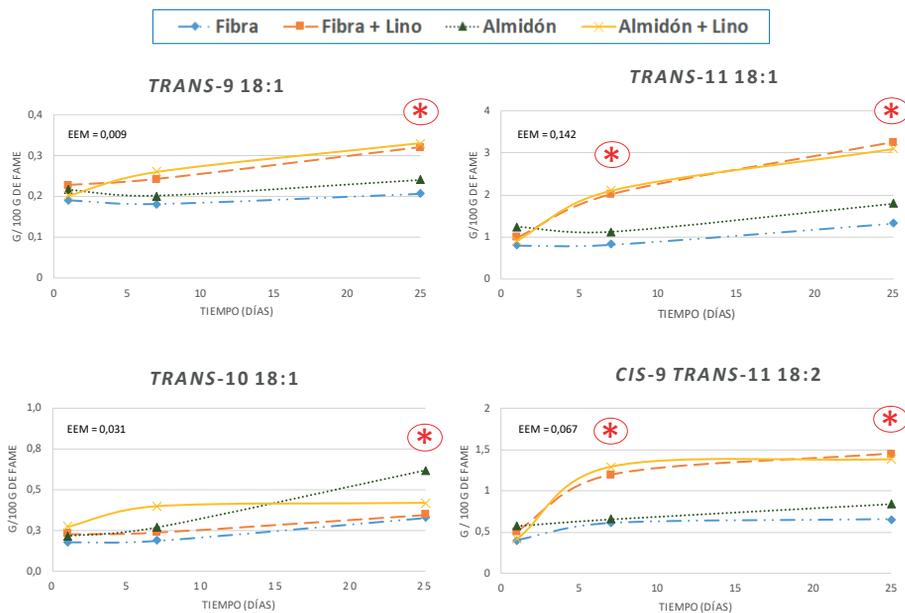


FIGURA 3.3. Evolución temporal los ácidos grasos *trans*-9 18:1, *trans*-10 18:1, *trans*-11 18:1 y *cis*-9 *trans*-11 18:2 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino. * Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos experimentales dentro de cada día de muestreo. EEM = error estándar de la media.

El mayor aumento de los contenidos de ácido ruménico se produjo durante la primera semana de suplementación con aceite de lino y sus niveles se mantuvieron estables el resto del período experimental (Figura 3.3). El porcentaje

de ácido ruménico en grasa láctea llegó a duplicarse tras el consumo de las dietas Fibra + Lino y Almidón + Lino, sin detectarse diferencias significativas entre los dos tipos de concentrado ensayados (Tabla 3.5). Estos resultados ponen de manifiesto que la adición de aceite de lino en las raciones es una estrategia nutricional efectiva para aumentar los contenidos de ácido linoleico conjugado en la grasa láctea de cabras, de la misma forma que ocurre con otras especies de rumiantes (Roy *et al.*, 2006; Bodas *et al.*, 2010; Soják *et al.*, 2015).

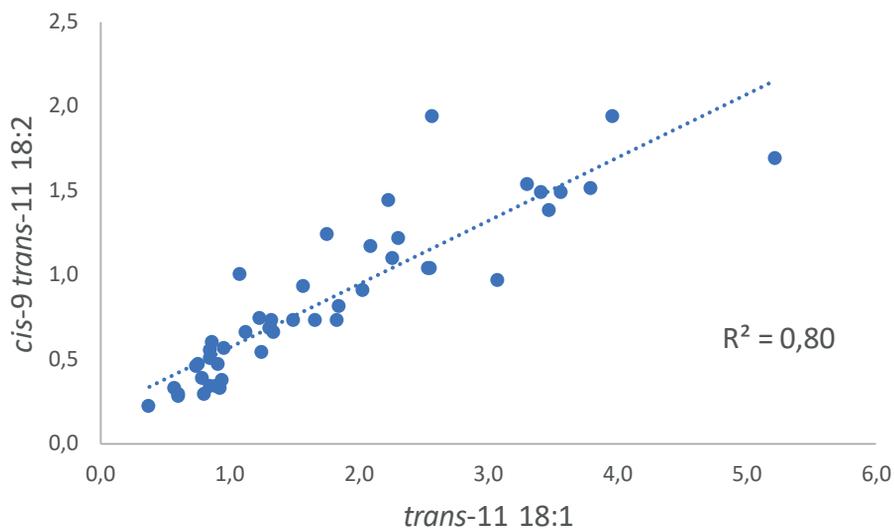


FIGURA 3.4. Regresión lineal entre los contenidos de *cis-9 trans-11 18:2* y *trans-11 18:1* en grasa de leche de cabra procedente de los 4 tratamientos experimentales.

El ácido *trans-9 18:1* siguió una respuesta similar a los ácidos grasos vacénico y ruménico, aunque no tan temprana. Las raciones suplementadas con 30 g / día de aceite de lino mostraron los mayores contenidos de *trans-9 18:1* en leche al final del período experimental (Día 25, Figura 3.3, Tabla 3.5). Respecto a los niveles de *trans-10 18:1*, éstos se mantuvieron bajos y estables a lo largo de todo el estudio y sólo se detectaron cambios significativos con el concentrado rico en almidón al concluir el experimento (Día 25, Figura 3.3, Tabla 3.5).

Estos resultados indicarían que el ácido α -linolénico presente en las raciones sigue la ruta principal de biohidrogenación descrita por Harfoot y Hazlewood (1997) que se presenta en la Figura 3.5. El primer paso de esta ruta implica la isomerización del doble enlace en posición 12 del ácido α -linolénico que se transfiere con configuración *trans* al carbono 11 para dar lugar al ácido rumelénico (*cis-9 trans-11 cis-15 18:3*). A continuación, una rápida hidrogeno-

nación del enlace *cis*-9 forma el ácido graso *trans*-11 *cis*-15 18:2 y, como resultado de una posterior hidrogenación del enlace *cis*-15, se obtiene el *trans*-11 18:1. La etapa limitante de este proceso es la reducción final del ácido vacénico a ácido esteárico (18:0). En consecuencia, el ácido graso *trans*-11 18:1 tiende a acumularse en el fluido post-ruminal, convirtiéndose en el isómero *trans* mayoritario detectado en la grasa de leche (Kraft *et al.*, 2003).

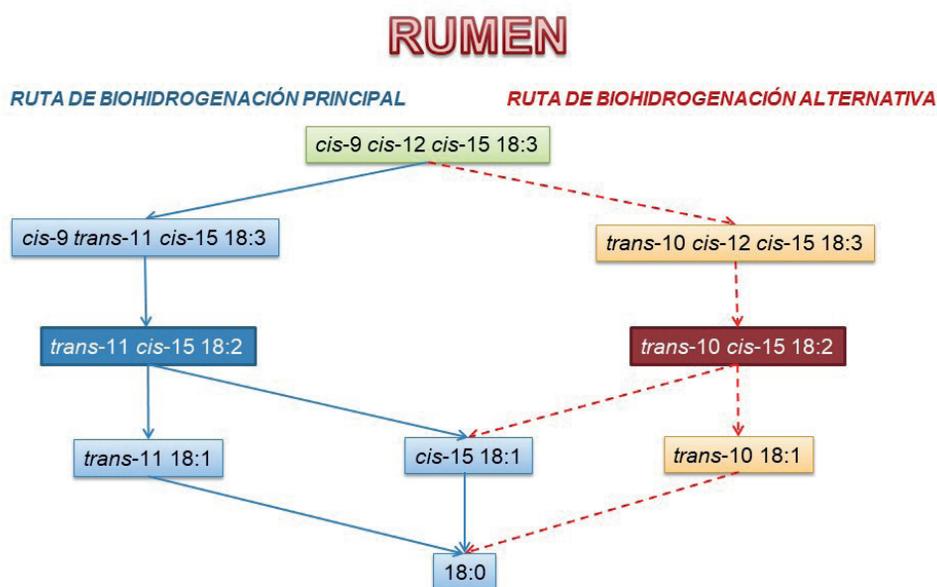


FIGURA 3.5. Ruta de biohidrogenación principal y alternativa del ácido α -linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 18:3) en el rumen.

Se ha documentado que dietas con una proporción elevada de carbohidratos digeribles y/o lípidos pueden provocar un cambio en las rutas de biohidrogenación ruminal (Figura 3.5) y aumentar los contenidos de *trans*-10 18:1 en la grasa de leche (Grinari y Bauman, 1999; Or-Rashid *et al.*, 2009). En nuestro estudio, los niveles de *trans*-10 18:1 no se vieron afectados por la suplementación con aceite de lino (Tabla 3.5). Únicamente se detectó un ligero aumento de *trans*-10 18:1 en la leche procedente de cabras alimentadas con el concentrado rico en almidón al final del período experimental (Día 25, Figura 3.3). El hecho de que los contenidos de *trans*-11 18:1 no disminuyeron en ninguna de las raciones ensayadas y que las concentraciones de *trans*-10 18:1 fueron bajas incluso con el concentrado rico en almidón (< 0.7 g / 100 g de ácidos grasos

totales), implicaría un predominio de la ruta de biohidrogenación principal del ácido α -linolénico en el rumen de estos animales. La estabilidad del metabolismo lipídico en las cabras lecheras que siguieron los tratamientos experimentales sería muy positiva desde el punto de vista nutricional de la grasa láctea. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la incorporación de 30 g / día de aceite de lino en la dieta de ganado caprino no altera las vías de biohidrogenación y que dicho suplemento lipídico es efectivo para mejorar el perfil de ácidos grasos de la leche. Además, la suplementación de la dieta de rumiantes con aceite de lino no sólo aumenta los contenidos de *trans*-11 18:1 y *cis*-9 *trans*-11 18:2 en la leche, sino que también disminuye la proporción de ácidos grasos saturados y enriquece la leche con ácidos grasos omega-3 (Bernard *et al.*, 2018).

Otros intermediarios de la ruta de biohidrogenación convencional del ácido α -linolénico, como el *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3 y el *trans*-11 *cis*-15 18:2, también aumentaron significativamente en grasa láctea cuando las dietas contenían aceite de lino en su composición (Figura 3.6).

Ambos ácidos grasos experimentaron una subida drástica durante la primera semana de suplementación y, a partir del Día 7, sus niveles se estabilizaron (Figura 3.6). De la misma forma que ocurrió con los ácidos vacénico y ruménico, los contenidos de *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3 y *trans*-11 *cis*-15 18:2 no se vieron alterados por el tipo de concentrado suministrado (Tabla 3.5). Esto pone de manifiesto que su presencia se debe fundamentalmente al aceite de lino de las raciones y es una prueba más de la importancia de la biohidrogenación ruminal del ácido α -linolénico en la composición de la grasa de leche.

Como se observa en la Figura 3.5, un cambio en el metabolismo lipídico podría favorecer la isomerización del enlace *cis*-9 del ácido α -linolénico a *trans*-10 para dar lugar al ácido graso *trans*-10 *cis*-12 *cis*-15 18:3 que, tras una rápida hidrogenación del enlace *cis*-12, generaría *trans*-10 *cis*-15 18:2. Desafortunadamente, el ácido graso *trans*-10 *cis*-15 18:2 no se puede determinar con las columnas capilares de cianopropil siloxano que se utilizan en los análisis de rutina de cromatografía de gases para determinar el perfil de ácidos grasos de la leche. *Trans*-10 *cis*-15 18:2 co-eluye con el ácido graso *trans*-11 *cis*-15 18:2 y, hasta la fecha, sólo es posible su separación mediante el empleo de fases estacionarias extremadamente polares, como la columna SLB-IL111 fabricada con líquidos iónicos (De la Fuente *et al.*, 2015).

Las grasas lácteas del presente estudio se analizaron con dos columnas capilares complementarias de 100 m, una columna polar clásica (CP-Sil88) y la columna SLB-IL111. El análisis con la columna SLB-IL111 permitió resolver ambos isómeros posicionales y el tiempo de análisis se redujo de forma notable (Figura 3.7). Los contenidos de *trans*-10 *cis*-15 18:2 y *trans*-11 *cis*-15 18:2 se calcularon según las fórmulas de la Tabla 3.3 y, en la Figura 3.8, se presentan los resultados al final del experimento (Día 25). En comparación con las dietas sin

suplementar con aceite de lino, los niveles de *trans*-10 *cis*-15 18:2 en grasa láctea se multiplicaron x 4 en el tratamiento Fibra + Lino y x 3 en el tratamiento Almidón + Lino. Además, no se detectaron diferencias significativas según el tipo de concentrado administrado. *Trans*-10 *cis*-15 18:2 siguió el mismo patrón que otros productos de biohidrogenación del ácido α -linolénico, como *trans*-11 *cis*-15 18:2 y *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3, lo que indica que el ácido α -linolénico suministrado por el aceite de lino es indispensable para que se forme *trans*-10 *cis*-15 18:2 en el rumen y aumenten sus contenidos en grasa de leche.

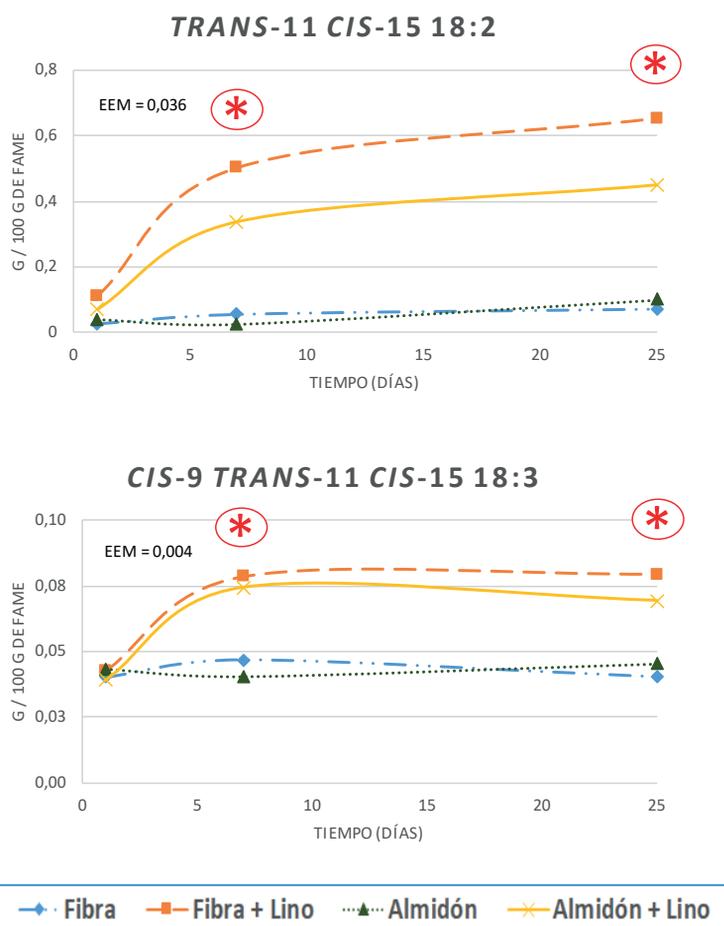


FIGURA 3.6. Evolución temporal los ácidos grasos *trans*-11 *cis*-15 18:2 y *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.

* Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos experimentales dentro de cada día de muestreo. EEM = error estándar de la media.

Otro ácido graso *trans* que se pudo discriminar gracias al empleo de la columna SLB-IL111 fue el *trans-7 cis-9 18:2*, el segundo isómero mayoritario de ácido linoleico conjugado presente en productos derivados de rumiantes (Delmonte *et al.*, 2011). La separación de los isómeros *trans-7 cis-9 18:2* y *cis-9 trans-11 18:2* no es posible cuando se utilizan columnas capilares convencionales y, a menudo, se llevan a cabo análisis complementarios por cromatografía de líquidos de alta eficacia con intercambiador de iones plata (Ag^+ -HPLC) para su resolución. En nuestro estudio, el empleo de la columna SLB-IL111 permitió separar el ácido graso *trans-7 cis-9 18:2* sin necesidad de recurrir a otras técnicas cromatográficas y sus contenidos se determinaron según la Tabla 3.3. No obstante, los niveles de *trans-7 cis-9 18:2* no se modificaron con ninguno de los tratamientos experimentales ensayados en los distintos días de muestreo (Tabla 3.5).

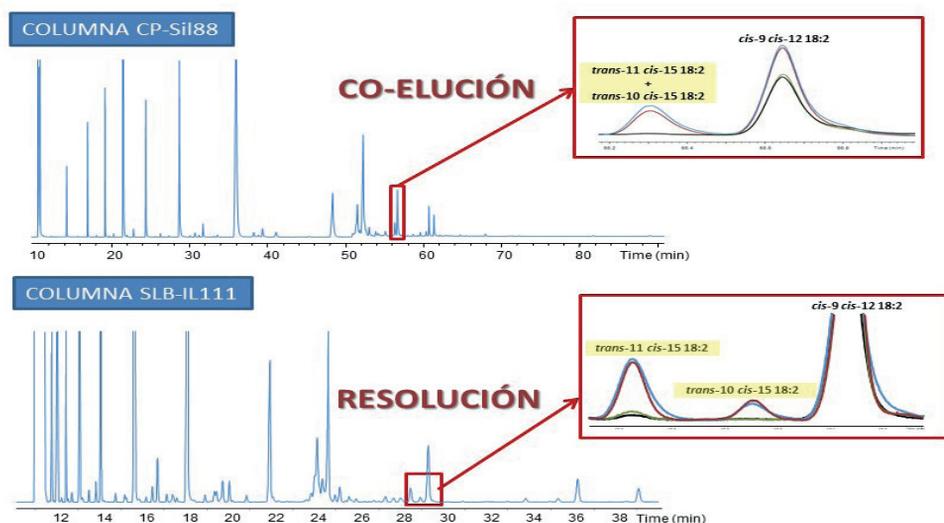


FIGURA 3.7. Separación cromatográfica de los isómeros *trans-11 cis-15 18:2* y *trans-10 cis-15 18:2* en grasa láctea caprina con dos columnas capilares complementarias de 100 m (CP-Sil88 y SLB-IL111).

Investigaciones recientes han puesto de manifiesto el complejo metabolismo lipídico del ácido α -linolénico en el rumen (Shingfield *et al.*, 2010; Białek *et al.*, 2017). En la actualidad, sólo existe consenso científico para la ruta de biohidrogenación principal del ácido α -linolénico, mientras que la ruta alternativa de biohidrogenación es todavía objeto de estudio (Figura 3.5). Al-

gunos autores han estimado que la microbiota ruminal podría generar hasta 14 isómeros posicionales y geométricos diferentes del ácido α -linolénico que darían lugar a un amplio espectro de intermediarios de biohidrogenación (Lee y Jenkins, 2011). De entre todos los ácidos grasos *trans* que se obtendrían, el sustrato *trans*-10 *cis*-15 18:2 es el que ha generado una mayor controversia en los últimos años. Sus contenidos no se han relacionado con una mayor presencia del ácido graso *trans*-10 18:1 en grasa láctea (Gómez-Cortés *et al.*, 2017) pese a ser el producto de biohidrogenación mayoritario en la ruta metabólica postulada por Griinari y Bauman (1999) (Figura 3.5).

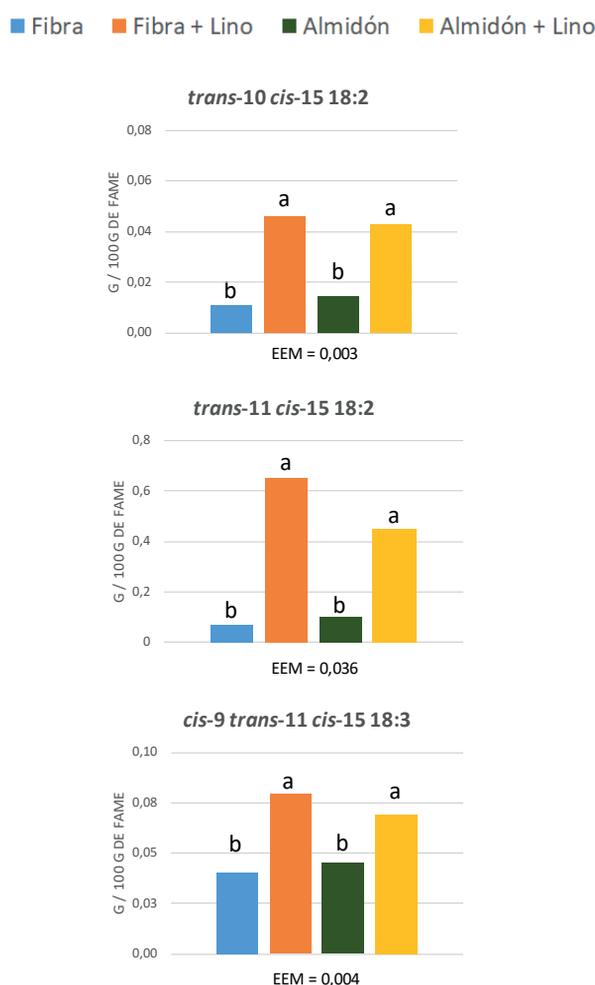


FIGURA 3.8. Contenido de los ácidos grasos *trans*-10 *cis*-15 18:2, *trans*-11 *cis*-15 18:2 y *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3 en la grasa láctea de cabras alimentadas durante 25 días con un concentrado rico en fibra, un concentrado rico en almidón o dichos concentrados mezclados con aceite de lino.

* a,b,c indican medias significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre tratamientos. EEM = error estándar de la media.

La relación existente entre *trans*-10 *cis*-15 18:2 y el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico ha sido plenamente demostrada en distintos estudios. Honkanen *et al.* (2016) incubaron muestras de fluido ruminal con ácido α -linolénico y observaron que la microbiota ruminal era capaz de formar *trans*-10 *cis*-15 18:2, entre otros intermediarios de biohidrogenación. En la misma línea, otras investigaciones han detectado un incremento de los contenidos de *trans*-10 *cis*-15 18:2 en fluido ruminal, carne y leche cuando la dieta de los animales rumiantes se suplementaba con semilla o aceite de lino (Alves y Bessa, 2014; Turner *et al.*, 2015, Gómez-Cortés *et al.*, 2017).

Por otra parte, todavía no existen evidencias suficientes que indiquen que *trans*-10 *cis*-12 *cis*-15 18:3 es el único precursor fisiológico de *trans*-10 *cis*-15 18:2 (Białek *et al.*, 2017). Kishino *et al.* (2009), en un estudio desarrollado *in vitro* en células de *Lactobacillus plantarum*, postularon una vía metabólica en la que *trans*-10, *cis*-15 18:2 podría formarse a partir del ácido α -linolénico vía *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3 y *trans*-9, *trans*-11, *cis*-15 18:3, sin generar cantidades relevantes de *trans*-10 18:1. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más investigaciones que permitan determinar las rutas metabólicas capaces de convertir el ácido α -linolénico en *trans*-10 *cis*-15 18:2 y si éstas implican o no cambios en el medioambiente ruminal y la formación de *trans*-10 18:1.

CONCLUSIONES

La composición del concentrado y la inclusión de aceite de lino en la dieta de cabras lecheras afecta al perfil lipídico de la grasa láctea, en especial a los ácidos grasos que proceden del metabolismo microbiano ruminal. La alimentación con un concentrado rico en almidón, en comparación con un concentrado rico en fibra neutro detergente, disminuye los contenidos de 15:0, 14:0 iso y 16:0 iso en grasa de leche. Las elevadas proporciones de almidón en la dieta están relacionadas con una caída del pH ruminal, lo que favorecería una mayor abundancia relativa de bacterias amilolíticas en el rumen de animales que consumen cantidades destacadas de carbohidratos digeribles. Aunque la suplementación de las raciones con aceite de lino apenas modifica los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados, la ingesta de ácido α -linolénico aumenta significativamente *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3, *trans*-11 *cis*-15 18:2 y *trans*-11 18:1 en la leche, intermediarios de la ruta principal de biohidrogenación de este ácido graso omega-3. Por otra parte, la adición de 30 g / día de aceite de lino a la dieta de cabras no altera el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico, y se mantienen bajos y estables los niveles de *trans*-10 18:1 en

grasa láctea. El aumento significativo de los contenidos de *trans*-10 *cis*-15 18:2 en las leches procedentes de los tratamientos que incluyeron aceite de lino en su composición, sería una evidencia de la relación existente entre este ácido graso y el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico. Existe la necesidad de llevar a cabo más estudios en este ámbito que permitan esclarecer las rutas de biohidrogenación del ácido α -linolénico en el rumen y, en especial, aquellas que están implicadas en la formación de *trans*-10 *cis*-15 18:2.

Conclusiones



1. En el capítulo 1 se muestran por primera vez las relaciones entre los contenidos de los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal. Los resultados indican que estas relaciones pueden utilizarse como un indicador no invasivo de los efectos de la dieta suministrada a los animales sobre las bacterias del rumen y la actividad de las enzimas de la glándula mamaria. Asimismo, conocer el sentido de dichas relaciones es relevante para la valoración de las cualidades nutritivas de la grasa láctea —desde el punto de vista de la salud humana— cuando se realicen modificaciones en la dieta de los animales.
2. El análisis discriminante lineal permitió separar acertadamente las muestras de grasa láctea de cabras que ingirieron raciones sin aceite de las que sí lo hicieron, por medio de cuatro ácidos grasos impares y ramificados —C7:0, metiltetradecanoato, C15:0 iso y la suma de C17:0+C17:1 *cis*-9— identificados y cuantificados por cromatografía gaseosa.
3. La clasificación de las muestras de grasa láctea de acuerdo con el grado de insaturación de los aceites suministrados a los animales tuvo una baja tasa de aciertos.
4. Los OBCFA de la grasa láctea fueron mejores indicadores de la presencia de aceite vegetal en la ración que del tipo de suplemento lipídico incluido en la misma.
5. La composición del concentrado y la inclusión de aceite de lino en la dieta de cabras lecheras afecta al perfil lipídico de la grasa láctea, en especial a los ácidos grasos que proceden del metabolismo microbiano ruminal.
6. La alimentación con un concentrado rico en almidón, en comparación con uno rico en fibra neutro detergente, disminuye los contenidos de 15:0, 14:0 iso y 16:0 iso en grasa de leche.
7. Las elevadas proporciones de almidón en la dieta están relacionadas con una caída del pH ruminal, lo que favorecería una mayor abundancia relativa de bacterias amilolíticas en el rumen de animales que consumen cantidades destacadas de carbohidratos digeribles.
8. La suplementación de las raciones con aceite de lino apenas modifica los contenidos de ácidos grasos impares y ramificados, la ingesta de ácido α -linolénico aumenta significativamente *cis*-9 *trans*-11 *cis*-15 18:3, *trans*-11

cis-15 18:2 y *trans*-11 18:1 en la leche, intermediarios de la ruta principal de biohidrogenación de este ácido graso omega-3.

9. La adición de 30 g / día de aceite de lino a la dieta de cabras no altera el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico, y se mantienen bajos y estables los niveles de *trans*-10 18:1 en grasa láctea. El aumento significativo de los contenidos de *trans*-10 *cis*-15 18:2 en las leches procedentes de los tratamientos que incluyeron aceite de lino en su composición, sería una evidencia de la relación existente entre este ácido graso y el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico.
10. Existe la necesidad de llevar a cabo más estudios en este ámbito que permitan esclarecer las rutas de biohidrogenación del ácido α -linolénico en el rumen y, en especial, aquellas que están implicadas en la formación de *trans*-10 *cis*-15 18:2.

Resumen

La grasa de la leche de las hembras rumiantes se distingue de las de otros mamíferos terrestres por contener más de 400 ácidos grasos, diversidad debida al metabolismo lipídico de los microorganismos ruminales y la actividad enzimática de la glándula mamaria. La grasa láctea contiene ácidos grasos singulares procedentes de la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados de la dieta y de la síntesis de novo bacteriana a partir de los ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación ruminal de los carbohidratos y los aminoácidos. El aporte de estos ácidos grasos a la dieta humana depende, casi exclusivamente, de la grasa láctea y han despertado gran interés en los últimos años porque numerosos estudios señalan que algunos de ellos pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud humana. Estos descubrimientos han propiciado un creciente interés por la manipulación del perfil de ácidos grasos de la grasa láctea mediante la modificación de las características y la composición de la dieta ofrecida a los animales, especialmente la inclusión de fuentes de grasa vegetales ricas en ácidos grasos insaturados. Así mismo, las relaciones entre los isómeros de la biohidrogenación ruminal y los ácidos grasos impares y pueden usarse como indicador no invasivo de los efectos de la dieta sobre las bacterias ruminales. Establecer las relaciones de los isómeros de la biohidrogenación ruminal con los ácidos grasos impares y ramificados de los lípidos bacterianos en la grasa láctea sería clave para interpretar el impacto de la dieta suministrada al rumiante sobre las poblaciones microbianas del rumen y su repercusión en los atributos nutritivos de la grasa de la leche y sus productos derivados. Por ello, los objetivos planteados en la presente Tesis fueron: 1) Esclarecer las relaciones entre los ácidos grasos de la leche derivados del metabolismo lipídico de las bacterias del rumen –ácidos grasos impares y ramificados e intermediarios de la biohidrogenación ruminal; 2) Uso de técnicas estadísticas avanzadas para determinar la utilidad de los ácidos grasos de la leche derivados del metabolismo lipídico microbiano como predictores de la

composición de la dieta consumida por los animales; 3) estudiar los cambios en los contenidos de algunos ácidos grasos e índices de la grasa láctea, relevantes desde el punto de vista de la salud humana, tras la inclusión de aceite vegetales con diferente grado de insaturación en la dieta. Para la consecución del primer objetivo se utilizaron los datos de composición de la grasa láctea de 112 muestras individuales, obtenidas en una serie de cinco experimentos que investigaron los cambios de los ácidos grasos de la leche en respuesta a la inclusión de aceites vegetales en la dieta de cabras. En todos los experimentos, las condiciones de manejo y la ración basal suministrada fue similar, con excepción del aceite añadido. Se obtuvieron numerosas correlaciones significativas. Los cambios opuestos simultáneos en los contenidos de algunos ácidos grasos de ambos grupos permitieron identificar a determinadas especies bacterianas del rumen por su doble papel en la degradación de los carbohidratos y en la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos de la dieta. En este sentido, se observó que las condiciones que favorecieron la acumulación relativa de isómeros monoinsaturados respecto a su producción tuvieron un efecto negativo sobre las bacterias del grupo B de la biohidrogenación, así como un efecto negativo sobre las bacterias celulolíticas. Igualmente, las relaciones negativas observadas reflejaron cambios en la actividad enzimática de la glándula mamaria. En conjunto, los resultados obtenidos indican que las relaciones entre los ácidos grasos impares y ramificados y los isómeros de la biohidrogenación ruminal en la grasa láctea pueden utilizarse como un indicador no invasivo de los efectos de la dieta suministrada a los animales sobre las bacterias del rumen y la actividad de las enzimas de la glándula mamaria. Los contenidos en ácidos grasos impares y ramificados (OBCFA) determinados mediante cromatografía gaseosa en 94 muestras de grasa láctea se utilizaron para identificar el tipo de ración consumida por cabras mediante análisis discriminante lineal. De un total de 21 variables en la dieta, cuatro fueron seleccionadas como predictores válidos. La prueba de Wilks fue altamente significativa, indicando que el análisis discriminante era aplicable a los datos del presente estudio. Los resultados obtenidos indican que los OBCFA de la grasa láctea no sirven para identificar el tipo de aceite vegetal incluido en la ración de cabras, pero permiten diferenciar la grasa láctea de las raciones con y sin aceite añadido mediante análisis discriminante lineal. Para evaluar la influencia de la incorporación de aceite de lino (30 g/día) en la dieta de cabras lecheras, comparando a su vez dos tipos de concentrado, uno rico en fibra neutro detergente y otro con alto contenido en almidón se dispusieron cuatro dietas y se suministraron durante 25 días. Se tomaron muestras de leche en diferentes días y se investigaron los efectos que los distintos tratamientos ejercían sobre los ácidos grasos derivados del metabolismo microbiano ruminal, principalmente ácidos grasos de cadena impar, ramificada y ácidos grasos trans. La alimentación con un concentrado rico

en fibra neutro detergente mostró los contenidos más elevados de los ácidos grasos 15:0, 14:0 iso y 16:0 iso en leche, que disminuyeron significativamente cuando ese mismo concentrado se suplementó con aceite de lino. En contraste, el concentrado rico en almidón presentó niveles más bajos de 15:0, 14:0 iso y 16:0 iso, y sus porcentajes no variaron cuando se adicionó el aceite. Respecto a los ácidos grasos trans, sus niveles aumentaron significativamente en los tratamientos que incluyeron aceite de lino en su composición, pero no se observaron diferencias según la composición del concentrado. En el presente trabajo se detalla la evolución temporal de estos ácidos grasos minoritarios relacionados con el metabolismo microbiano y se discute la presencia de los mismos en la grasa láctea, fruto del proceso de biohidrogenación ruminal del ácido α -linolénico.



Abstract

The milk fat of the ruminant females is distinguished from those of other terrestrial mammals because it contains more than 400 fatty acids, this diversity is due to the lipid metabolism of ruminal microorganisms and the enzymatic activity of the mammary gland. Dairy fat includes unique fatty acids from the ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from the diet and the synthesis of bacterial de novo from volatile fatty acids produced during the ruminal fermentation of carbohydrates and amino acids. The contribution of these fatty acids to the human diet depends almost exclusively on milk fat and it has aroused great interest in recent years because numerous studies indicate that some of them may have beneficial effects on human health. These discoveries have led to a growing interest in the manipulation of the fatty acid profile of milk fat by modifying the characteristics and composition of the diet that is offered to animals, especially the inclusion of vegetable fat sources rich in unsaturated fatty acids. Likewise, the relationships between the isomers of ruminal biohydrogenation and odd fatty acids can be used as a non-invasive indicator of the effects of diet on ruminal bacteria. Establishing the relationships of the isomers of ruminal biohydrogenation with the odd and branched fatty acids of bacterial lipids in milk fat would be key to interpreting the impact of the diet supplied to the ruminant on the microbial populations of the rumen and its effects on nutritional attributes. of milk fat and its derived products. Therefore, the objectives set out in this Thesis were: 1) Clarifying the relationships between milk fatty acids derived from the lipid metabolism of rumen bacteria (odd and branched fatty acids and intermediates of ruminal biohydrogenation); 2) The use of advanced statistical techniques to determine the utility of milk fatty acids derived from microbial lipid metabolism as predictors of the composition of the diet that is consumed by animals; 3) Studying the changes in the contents of some fatty acids and milk fat indices, which are relevant from the point of view of human health, after the inclusion of vegetable oils with different degrees of unsaturation in the diet. For the achievement of the first objective, the data on the composition of milk fat from 112 individual

samples were used, these were obtained in a series of five experiments that investigated changes in milk fatty acids in response to the inclusion of vegetable oils in the diet of goats. In all experiments, the handling conditions and the basal ration provided were similar, with the exception of the added oil. Numerous significant correlations were obtained. The simultaneous opposite changes in the contents of some fatty acids of both groups allowed to identify certain bacterial species of the rumen due to its double role in the degradation of carbohydrates and in the ruminal biohydrogenation of dietary fatty acids. In this sense, it was observed that the conditions that favored the relative accumulation of monounsaturated isomers with respect to their production had a negative effect on the B group bacteria of the biohydrogenation, as well as a negative effect on the cellulolytic bacteria. Likewise, the negative relationships observed reflected changes in the enzymatic activity of the mammary gland. Taken together, the results obtained indicate that the relationships between odd and branched fatty acids and isomers of ruminal biohydrogenation in milk fat can be used as a non-invasive indicator of the effects of the diet given to animals on rumen bacteria and the activity of the mammary gland enzymes. The odd and branched fatty acid (OBCFA) contents determined by gas chromatography in 94 samples of milk fat were used to identify the type of ration consumed by goats by linear discriminant analysis. From a total of 21 variables in the diet, four were selected as valid predictors. The Wilks test was highly significant, indicating that the discriminant analysis was applicable to the data of the present study. The results obtained indicate that the OBCFA of the milk fat do not serve to identify the type of vegetable oil included in the ration of goats, but they allow to differentiate the milk fat from the rations with and without oil added by linear discriminant analysis. In order to evaluate the influence of the incorporation of flax oil (30 g / day) in the diet of dairy goats, in turn comparing two types of concentrate, one rich in neutral detergent fiber and another with high starch content four diets were arranged and were supplied for 25 days. Milk samples were taken on different days and the effects that different treatments exerted on fatty acids derived from ruminal microbial metabolism, mainly odd, branched chain fatty acids and trans fatty acids, were investigated. Feeding with a concentrate rich in detergent neutral fiber showed the highest contents of 15:0, 14:0 iso and 16:0 iso fatty acids in milk, which decreased significantly when that same concentrate was supplemented with flax oil. In contrast, the starch-rich concentrate showed lower levels of 15:0, 14:0 iso and 16:0 iso, and their percentages did not change when the oil was added. Regarding trans fatty acids, their levels increased significantly in treatments that included flax oil in their composition, but no differences were observed according to the composition of the concentrate. In this work, the temporal evolution of these minor fatty acids related to microbial metabolism is detailed and their presence in milk fat is discussed, as a result of the ruminal biohydrogenation process of α -linolenic acid.

Bibliografía

AbuGhazaleh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. F. Kalscheur, and L. A. Whitlock. 2002. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. *J. Dairy Sci.* 85(9):2266-2276.

Aldai, N., de Renobales, M., Barrón, L.J.R., Kramer, J.K.G. (2013). What are the trans fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced trans fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1378-1401.

Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J., & Juárez, M. (1999). Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 878-884.

Alves, S. P. and R. J. B. Bessa. 2014. The *trans*-10,*cis*-15 18:2: a Missing Intermediate of *trans*-10 Shifted Rumen Biohydrogenation Pathway? *Lipids* 49(6):527-541.

Amigo, L., y Fontecha, J. (2011). Goat Milk. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 3, 2ª edición, Fuquay, J.W., Fox, P.F., y McSweeney, P.L.H. eds. Academic Press, San Diego, EE.UU. pp. 484-493.

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Ares, I., Ramos, E., Gómez-Cortés, Juárez, M., y De la Fuente, M.A. (2010). Acute oral safety study of dairy fat rich in *trans*-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 591-598.

Bas, P., Archimède, H., Rouzeau, A., y Sauvant, D. (2003). Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: effect of concentration and type of forage. *Journal of Dairy Science*, 86, 2940-2948.

Bauchart, D., F. Legay-Carmier, and M. Doreau. 1990. Ruminant hydrolysis of dietary triglycerides in dairy cows fed lipid-supplemented diets. *Reproduction, nutrition, development Suppl* 2:187s.

Bauchart, D., Legay-Carmier, F., Doreau, M., y Gaillard, B. (1990). Lipid metabolism of liquid-associated and solid adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *British Journal of Nutrition*, 63, 563-578.

- Bauman, D.E., y Mather, I.H., Wall, R.J., y Lock, A.L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal Dairy Science*, 89, 1235-1243.
- Baumann E., Chouinard P.Y., Lebeuf, Y., Rico, D.E., y Gervais, R. (2016). Effect of lipid supplementation on milk odd- and branched-chain fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 6311–6323.
- Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505-531.
- Belury, M.A., Moya-Camarena, S.Y., Lu, M., Shi, L.L., Leesnitzer, L.M., y Blanchard, S.G. (2002). Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutrition Research*, 22, 817-824.
- Bendsen, N.T., Christensen, R., Bartels, E.M., y Astrup, A. (2011). Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65, 773-783.
- Bernard, L., M. Bonnet, C. Delavaud, M. Delosiere, A. Ferlay, H. Fougere, and B. Graulet. 2018. Milk Fat Globule in Ruminant: Major and Minor Compounds, Nutritional Regulation and Differences Among Species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120(5):27.
- Bernard, L., Mouriot, J., Rouel, J., Glasser, F., Capitan, P., Pujos-Guillot, E., Chardigny, J.M., & Chilliard, Y. (2010). 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. *British Journal of Nutrition*, 104(03), 346-354.
- Bernard, L., Shingfield, K. J., Rouel, J., Ferlay, A., & Chilliard, Y. (2009). Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. *British Journal of Nutrition*, 101(2), 213-224.
- Bessa, R. J. B., Maia, M. R. G., Jerónimo, E., Belo, A. T., Cabrita, A. R. J., Dewhurst, R. J., & Fonseca, A. J. M. (2009). Using microbial fatty acids to improve understanding of the contribution of solid associated bacteria to microbial mass in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 150(3), 197-206.
- Białek, M., M. Czauderna, and A. Białek. 2017. Conjugated linolenic acid (CLnA) isomers as new bioactive lipid compounds in ruminant-derived food products. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* 26(1):3-17.
- Bichi, E., Toral, P. G., Hervás, G., Frutos, P., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., & De la Fuente, M. A. (2012). 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. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5242-5252.
- Bodas, R., Manso, T., Mantecón, A. R., Juárez, M., De la Fuente, M. A., & Gómez-Cortés, P. (2010). Comparison of the fatty acid profiles in cheeses from ewes fed diets supplemented with different plant oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10493-10502.

- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., y López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78-93.
- Brouwer, I.A., Wanders, A.J., y Katan, M.B. (2013). Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed?. *European Journal of Nutrition*, 67, 541-547.
- Bruen, R., Fitzsimons, S., y Belton, O. (2017). Atheroprotective effects of conjugated linoleic acid. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83, 46-53.
- Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., & Cabiddu, A. (2012). Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174(1), 1-25.
- Cabrita, A.R.J., Vale, J.M.P., Bessa, R.J.B., Dewhurst, R.J., y Fonseca, A.J.M. (2009). Effects of dietary starch source and buffers on milk responses and rumen fatty acid biohydrogenation in dairy cows fed maize silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 152, 267-277.
- Cai Q, Huang H, Qian D, Chen K, Luo J, Tian Y, Lin T, Lin T (2013). 13-Methyltetradecanoic acid exhibits anti-tumor activity on T-Cell lymphomas in vitro and in vivo by downregulating p-AKT and activating caspase-3. *PLoS ONE* 8(6):e65308.
- Chilliard, Y., & Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 467-492.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., y Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., y Doreau, M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science*, 92, 5199-5211.
- Churrua, I., Fernández-Quintela, A. y Portillo, P., Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects. *Biofactors*, 35, 105-111.
- Cívico, A., Núñez Sánchez, N., Gómez-Cortés, P., De la Fuente, M.A., Peña Blanco, F., Juárez, M., Schiavone, A., y Martínez Marín, A.L. (2017). Odd- and branched-chain fatty acids in goat milk as indicators of diet composition. *Italian Journal of Animal Science*, 16(1):68-74.
- Clark, S., y Mora García, M.B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, 100, 10026-10044.
- Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., y Bosset, O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12, 649-659.
- Croom, W.J.Jr., Bauman, D.E., y Davis, C.L. (1981). Methylmalonic acid in low-fat milk syndrome. *Journal of Dairy Science*, 64, 649-654.

De la Fuente, M. A., V. Rodríguez-Pino, and M. Juárez. (2015). Use of an extremely polar 100- μ m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles. *International Dairy Journal* 47:52-63.

De la Fuente, M.A. y Juárez, M. (2004). El ácido linoleico conjugado en la leche y los productos lácteos. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 11, 101-113.

Delmonte, P., A.-R. Fardin Kia, J. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, L. Sidisky, and J. I. Rader. 2011. Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *Journal of Chromatography A* 1218(3):545-554.

Destailats, F., Trottier, J.P., Galvez, J.M.G., y Angers, P. (2005). Analysis of α -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal of Dairy Science*, 88, 3231–3239.

Dewhurst, R.J., Moorby, J.M., Vlaeminck, B., Van Nespen, T., y Fievez, V. (2007). Apparent recovery of duodenal odd- and branched-chain fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1775–1780.

Dilzer, A., y Park, Y. (2012). Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 488-513.

Doreau, M. and A. Ferlay. 1994. Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 45(3-4):379-396.

Doreau, M., Laverroux, S., Normand, J., Chesneau, G., y Glasser, F. (2009). Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids*, 44, 53-62.

EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids, *The EFSA Journal*. 81, 1-49.

Enjalbert, F., Combes, S., Zened, A., y Meynadier, A. (2017). Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 782-797.

European Commission. (2015). Report from the Commission to the European Parliament and the Council regarding trans fats in foods and in the overall diet of the Union population. COM, 619, 1-15.

Falchero, L., Lombardi, G., Gorlier, A., Lonati, M., Odoardi, M., y Cavallero, A. (2010). Variation in fatty acid composition of milk and cheese from cows grazed on two alpine pastures. *Dairy Science and Technology*, 90, 657-672.

FAO (2018). Dairy Market Review, April 2018. FAO, Roma, Italia.

FENIL (2017). Producción del sector lácteo en 2017. <http://fenil.org/>

- Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J.B., y Chilliard, Y. (2006). Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science*, 89, 4026-4041.
- Ferlay, A., Bernard, L., Meynadier, A., y Malpuech-Brugere, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, 141, 107-120.
- Field, C. J., Blewett, H. H., Proctor, S., & Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(5), 979-991.
- Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J. M., Stefanov, I., & Vlaeminck, B. (2012). Milk odd-and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function-An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172(1), 51-65.
- Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J. M., Stefanov, I., y Vlaeminck, B. (2012). Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function-An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 51-65.
- Fievez, V., Vlaeminck, B., Dhanoa, M. S., & Dewhurst, R. J. (2003). Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acids in milk. *Journal of Dairy Science*, 86(12), 4047-4053.
- Forouhi, N.G., Koulman, A., Sharp, S.J., Imamura, F., Kroger, J., Schulze, M.B., Crowe, F.L., Huerta, J.M., *et al.* (2014). Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2, 810-818.
- French, E.A., Bertics, S.J., y Armentano, L.E. (2012). Rumen and milk odd-and branched-chain fatty acid proportions are minimally influenced by ruminal volatile fatty acid infusions. *Journal of Dairy Science*, 95, 2015-2026.
- Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., y Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4456-4466.
- Gaspardo, B., Lavrenčič, A., Levart, A., Del Zotto, S., & Stefanon, B. (2010). Use of milk fatty acids composition to discriminate area of origin of bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3417-3426.
- Gayet-Boyer, C., Tenenhaus-Aziza, F., Prunet, C., Marmonier, C., Malpuech-Brugère, C., Lamarche, L. y Chardigny, J.M. (2014). Is there a linear relationship between the dose of ruminant *trans*-fatty acids and cardiovascular risk markers in healthy subjects: results from a systematic review and meta-regression of randomised clinical trials. *British Journal of Nutrition*, 112, 1914-1922.
- Gebauer, S.K., Chardigny, J.M., Jakobsen, M.U., Lamarche, B., Lock, A.L., Proctor, S.D. y Baer, D.J. (2011). Effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and cancer: A comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Advances in Nutrition*, 2, 332-354.

Gebauer, S.K., Destailats, F., Dionisi, F., Krauss, R.M., y Baer, D.J. (2015). Vaccenic acid and trans fatty acid isomers from partially hydrogenated oil both adversely affect LDL cholesterol: a double-blind, randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 102, 1339-1346.

Gervais, R., Vlaeminck, B., Fanchone, A., Nozière, P., Doreau, M., y Fievez, V. (2011) Odd-and branched-chain fatty acids duodenal flows and milk yields in response to N underfeeding and energy source in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, (Suppl. 1), 125-126.

Glasser, F., Schmidely, P., Sauvant, D., y Doreau, M. (2008). Digestion of fatty acids in ruminants: A meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal*, 2, 691-704.

Goetsch, A. L. 2019. Recent research of feeding practices and the nutrition of lactating dairy goats. *Journal of Applied Animal Research* 47(1):103-114.

Gómez-Cortés P., Toral, P.G., Frutos, P., Juárez M., De la Fuente, M.A., y Hervás, G. (2011b). Effect of the supplementation of dairy sheep diet with incremental amounts of sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *Food Chemistry*, 125, 644-651.

Gómez-Cortés, P. y De la Fuente, M.A. (2010). El ácido linoleico conjugado como agente anticancerígeno. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 17, 68-78.

Gómez-Cortés, P., A. Bach, P. Luna, M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 2009. Effects of extruded linseed supplementation on n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid in milk and cheese from ewes. *J. Dairy Sci.* 92(9):4122-4134.

Gómez-Cortés, P., A. Cívico, M. A. de la Fuente, M. Juárez, N. N. Sánchez, F. P. Blanco, y A. L. M. Marín. 2017. Dietary linseed oil increases *trans*-10, *cis*-15 18:2 in caprine milk fat. *J. Dairy Sci.* 100(6):4235-4240.

Gómez-Cortés, P., De la Fuente, M.A., Toral, P.G., Frutos, P., Juárez, M., y Hervás, G. (2011a). Effects of different forage:concentrate ratios in dairy ewes diets supplemented with sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 94, 4578-4588.

Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A.R., Juárez, M., De la Fuente, M.A., y Hervás, G. (2009a). Effect of supplementation of grazing Dairy ewes with a cereal concentrate on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 92, 3964-3972.

Gómez-Cortés, P., Juárez, M., y De la Fuente, M.A. (2018). Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. *Trends in Foods Science and Technology*, 81, 1-9.

Gómez-Cortés, P., Tyburczy, C., Brenna, J.T., Juárez, M. and De la Fuente, M.A. (2009b). Characterization of *cis*-9, *trans*-11, *trans*-15-C18:3 in milk fat by GC and covalent adduct chemical ionization tandem MS. *Journal of Lipid Research*, 50, 2412-2420.

Gordon, M.H. (2013). Milk lipids. En: *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*, Park Y.W. y Haenlein, G.F.W. eds. Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido, pp. 65-79.

Griinari J.M., Bauman D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ (eds) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL, pp 180–200

Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., & Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *Journal of Nutrition*, 130(9), 2285–2291.

Ha, J. K., & Lindsay, R. C. (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 677–690.

Ha, Y. L., Grimm, N. K. y Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881–1887.

Halmemies-Beauchet-Filleau, A., K. J. Shingfield, I. Simpura, T. Kokkonen, S. Jaakkola, V. Toivonen, and A. Vanhatalo. 2017. Effect of incremental amounts of camelina oil on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on a mixture of grass and red clover silage and concentrates containing camelina expeller. *J. Dairy Sci.* 100(1):305–324.

Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Lampi, A.M., Toivonen, V., Shingfield, K.J., y Vanhatalo, A. (2011). Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed red clover silage based diets. *Journal of Dairy Science* 94, 4413–4430.

Harfoot, C., Hazlewood, G. (1997) Lipid metabolism in the rumen. In *The Rumen Microbial Ecosystem* pp. 382–426. Hobson, P.N., Stewart, C.S. Eds. Chapman and Hall: London, UK.

Herrera-Meza, M.S., Mendoza-López, M.R., García-Barradas, O., Sánchez-Otero, M.G., Silva-Hernández, E.R., Angulo, J.O. y Oliart-Ros, R.M. (2013). Dietary anhydrous milk fat naturally enriched with conjugated linoleic acid and vaccenic acid modify cardiovascular risk biomarkers in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 575–586.

Honkanen, A. M., H. Leskinen, V. Toivonen, N. McKain, R. J. Wallace, and K. J. Shingfield. 2016. Metabolism of α -linolenic acid during incubations with strained bovine rumen contents: products and mechanisms. *British Journal of Nutrition* 115(12):2093–2105.

Hristov, A.N., Domitrovich, C., Wachter, A., Cassidy, T., Lee, C., Shingfield, K.J., Kairenius, P., Davis, J. y Brown, J. (2011). Effect of replacing solvent-extracted canola meal with high-oil traditional canola, high-oleic acid canola, or high-erucic acid rapeseed meals on rumen fermentation, digestibility, milk production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 4057–4074.

Inglingstad, R. A., S. Skeie, G. E. Vegarud, T. G. Devold, Y. Chilliard, and M. Eknæs. 2017. Feeding a concentrate rich in rapeseed oil improves fatty acid composition and flavor in Norwegian goat milk. *J. Dairy Sci.* 100(9):7088–7105.

Inoue, T., Shingaki, R. y Fukui, K. (2008). Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 281, 81–86.

INRA, Institut National de la Recherche Agronomique. (2002). *Tables de Composition et de Valeur Nutritive des Matières Premières Destinées aux Animaux d'Élevage*. Editorial INRA, Paris.

ISO-IDF (2002) Milk fat-Preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182:2002.

Jacome-Sosa, M., Vacca, C., Mangat, R., Diane, A., Nelson, R.C., Reaney, M.J., Shen, J.H., Curtis, J.M., Vine, D.F., Field, C.J., Igarashi, M., Piomelli, D., Banni, S. y Proctor, S.D. (2016). Vaccenic acid suppresses intestinal inflammation by increasing anandamide and related N-acyl ethanolamines in the JCR:LA-cp rat. *Journal of Lipid Research*, 57, 638–649.

Jacome-Sosa, M.M., Borthwick, F., Mangat, R., Uwiera, R., Reaney, M.J., Shen, J.H., Quiroga, A.D., Jacobs, R.L., Lehner, R. y Proctor, S.D. (2014). Diets enriched in *trans*-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 692–701.

Jakobsen, M.U., Overvad, K., Dyerberg, J. y Heitman, B.L. (2008). Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. *International Journal of Epidemiology* 37, 173–182.

Jaudszus, A., Jahreis, G., Schlormann, W., Fischer, J., Kramer, R., Degen, C., Rohrer, C., Roth, A., Gabriel, H., Barz, D., y Gruen, M. (2012). Vaccenic acid-mediated reduction in cytokine production is independent of c9,t11-CLA in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821, 1316–1322.

Jaudszus, A., Mainz, J.G., Pittag, S., Dornaus, S., Dopfer, C., Roth, A. y Jahreis, G. (2016). Effects of a dietary intervention with conjugated linoleic acid on immunological and metabolic parameters in children and adolescents with allergic asthma-A placebo-controlled pilot trial. *Lipids in Health and Disease*, 15, 21.

Jenkins, B., West, J.A., y Koulman, A. (2015). A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules*, 20, 2425–2444.

Jenkins, B.J., Seyssel, K., Chiu, S., Pan, P.H., Lin, S.Y., Stanley, E., Ament, Z., West, J.A., Summerhill, K., Griffin, J.L., Vetter, W., Autio, K.J., Hiltunen, K., Hazebrouck, S., Stepankova, R., Chen, C.J., Alligier, M., Lavelle, M., Moore, M., Kraft, G., Cherrington, A., King, S., Krauss, R.M., de Schryver, E., Van Veldhoven, P.P., Ronis, M., y Koulman, A. (2017). Odd Chain Fatty Acids: New insights of the relationship between the gut microbiota, dietary intake, biosynthesis and glucose intolerance. *Scientific Reports*, 7, 44845.

Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85, 295–350.

- Jun, H.K. (2016). Conjugated linoleic acid: potential health benefits as a functional food ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 221-244.
- Kalscheur, K. F., Teter, B.B., Piperova, L.S. y Erdman, R.A. (1997). Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80, 2104-2114.
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus bacillus: An example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews*, 41, 391.
- Keeney, M., Katz, I., y Allison, J. (1962). On the probable origin of milk fat acids in rumen microbial lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 39, 198-201
- Kelley, N.S., Hubbard, N.E. y Erickson, K.L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *Journal of Nutrition*, 137, 2599-2607.
- Khaw, K.T., Friesen, M.D., Riboli, E., Luben, R., y Wareham, N. (2012). Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: The EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Medicine*, 9, e1001255.
- Kim, J.H., Kim, Y., Kim, Y.J. y Park, Y. (2016). Conjugated Linoleic Acid: Potential health benefits as a functional food ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 221-244.
- Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, and S. Shimizu. 2009. Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1):87-97.
- Kleber, M.E., Delgado, G.E., Lorkowski, S., Marz, W., y Von Schacky, C. (2016). *Trans*-fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *European Heart Journal*, 37, 1072-1078.
- Kraft, J., M. Collomb, P. Mockel, R. Sieber, and G. Jahreis. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 38(6):657-664.
- Kucuk, O., B. W. Hess, P. A. Ludden, and D. C. Rule. 2001. Effect of forage : concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *Journal of Animal Science* 79(8):2233-2240.
- Kuhnt, K., Degen, C., y Jahreis G. (2016). Evaluation of the Impact of Ruminant Trans Fatty Acids on Human Health: Important Aspects to Consider. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1964-80.
- Lee, Y.-J. and T. C. Jenkins. 2011. Biohydrogenation of Linolenic Acid to Stearic Acid by the Rumen Microbial Population Yields Multiple Intermediate Conjugated Diene Isomers. *The Journal of Nutrition* 141(8):1445-1450.
- Leiber, F., Scheeder, M.R.L., Wettstein, H.R., Kreuzer, M., (2004). Milk fatty acid profile of cows under the influence of alpine hypoxia and high mountainous forage quality. *Journal of Animal Feed Science*, 13, 693-696.

- Li, F., Li, Z., Li, S., Ferguson, J.D., Cao, Y., Yao, J., Sun, F., Wang, X., y Yang, T. (2014b). Effect of dietary physically effective fiber on ruminal fermentation and the fatty acid profile of milk in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 97, 2281–2290.
- Li, F., Yang, X.J., Cao, Y.C., Li, S.X., Yao, J.H., Li, Z.J., y Sun, F.F. (2014a). Effects of dietary effective fiber to rumen degradable starch ratios on the risk of sub-acute ruminal acidosis and rumen content fatty acids composition in dairy goat. *Animal Feed Science and Technology*, 189, 54–62.
- Liang, J., Zhou, Q., Amakye, W.K., Su, Y., y Zhang, Z. (2018). Biomarkers of dairy fat intake and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta analysis of prospective studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1122–1130.
- Lim, J.N., Oh, J.J., Wang, T., Lee, J.S., Kim, S.H., Kim, Y.J., Lee, H.G. (2014). *trans*-11 18:1 Vaccenic Acid (TVA) has a direct anti-carcinogenic effect on MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells. *Nutrients*, 6, 627–636.
- Littell, R.C., Stroup, W.W., & Freund, R.J. (2002). *SAS for Linear Models*, 4th ed., SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Liu, L., Wang, Z., Park, H.G., Xu, C., Lawrence, P., Sub, X., Wijendrane, V., Walker, W.A., Kothapalli, K.S.D., y Brenna, J.T. (2017). Human fetal intestinal epithelial cells metabolize and incorporate branched chain fatty acids in a structure specific manner. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 116, 32–39.
- Lock, A.L., y Bauman, D.E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39, 1197–1206.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. (2005^a). Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology* 119(3-4):203-225.
- Loor, J. J., M. Doreau, J. M. Chardigny, A. Ollier, J. L. Sebedio, and Y. Chilliard. (2005^b). Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 119(3-4):227-246.
- Lordan, R. y Zabetakis, I. (2017). The anti-inflammatory properties of dairy lipids. *Journal of Dairy Science*, 100, 4197–4212.
- Luna, P., Bach, A., Juárez, M., & De La Fuente, M. A. (2008). Effect of a diet enriched in whole linseed and sunflower oil on goat milk fatty acid composition and conjugated linoleic acid isomer profile. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 20–28.
- Luna, P., M. Juarez, and M. A. de la Fuente. (2005). Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 88(10):3377-3381.
- MacGibbon, A. K.H., y Taylor, M.W. (2006). Composition and structure of bovine milk lipids. En: *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 2, Lipids, 3^a edición, Fox P.F. y McSweeney, P.L.H. eds. Springer, Nueva York, EE.UU, pp. 43–92.

Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., & Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10(1), 52.

Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L., y Wallace, R.J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 303–314.

Martínez Marín, A. L., Gómez-Cortés, P., Gómez Castro, G., Juárez, M., Pérez Alba, L., Pérez Hernández, M., & De la Fuente, M. A. (2011). Animal performance and milk fatty acid profile of dairy goats fed diets with different unsaturated plant oils. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5359-5368.

Martínez Marín, A. L., Gómez-Cortés, P., Gómez Castro, G., Juárez, M., Pérez Alba, L., Pérez Hernández, M., & De la Fuente, M. A. (2012a). Short communication: Linear discriminant analysis and type of oil added to dairy goat diets. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 4045-4049.

Martínez Marín, A. L., Gómez-Cortés, P., Gómez Castro, G., Juárez, M., Pérez Alba, L., Pérez Hernández, M., & De la Fuente, M. A. (2012b). Effects of feeding increasing dietary levels of high oleic or regular sunflower or linseed oil on fatty acid profile of goat milk. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1942-1955.

Martínez Marín, A. L., Gómez-Cortés, P., Núñez Sánchez, N., Juárez, M., Garzón Sigler, A. I., Blanco, F. P., y de la Fuente, M.A. (2015). Associations between major fatty acids in plant oils fed to dairy goats and C18 isomers in milk fat. *Journal of Dairy Research*, 82, 152-160.

Martínez Marín, A. L., Gómez-Cortés, P., Pérez Alba, L. M., Juárez, M., Gómez Castro, A. G., Pérez Hernández, M., & de la Fuente, M. A. (2013b). Adición de aceites vegetales a la dieta de cabras lecheras: efecto sobre el contenido de ácidos grasos de la grasa láctea. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45(3), 259-266.

Martínez Marín, A.L., Pérez Hernández, M., Carrión Pardo, D., Gómez Castro, G., y Garzón Sigler, A. I. (2013a). Efecto de los aceites y semillas en dietas para rumiantes sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4, 319-338.

Martínez-Marín, A.L., Gómez-Cortés, P., Gómez-Castro, G., Juárez, M., Pérez-Alba, L., Pérez-Hernández, M. y De la Fuente, M.A. (2011). Animal performance and milk fatty acid profile of dairy goats fed diets added differently unsaturated plant oils. *Journal Dairy Science*, 94, 5359–5368.

Martins, S.V., Lopes, P.A., Alfaia, C.M., Ribeiro, V.S., Guerreiro, T.V., Fontes, C.M.G.A., Castro, M.F., Soveral, G., y Prates, J.A.M. (2007). Contents of conjugated linoleic acid isomers in ruminant-derived foods and estimation of their contribution to daily intake in Portugal. *British Journal of Nutrition*, 98, 1206–1213.

Massart-Leëñ, A. M., & Massart, D. L. (1981). The use of clustering techniques in the elucidation or confirmation of metabolic pathways. Application to the branched-chain

fatty acids present in the milk fat of lactating goats. *Biochemical Journal*, 196(2), 611–618.

Massart-Leën, A. M., De Pooter, H., Decloedt, M., & Schamp, N. (1981). Composition and variability of the branched-chain fatty acid fraction in the milk of goats and cows. *Lipids*, 16(5), 286–292.

Massart-Leën, A.M., Roets, E., Peeters, G., y Verbeke, R. (1983). Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *Journal of Dairy Science*, 66, 1445–1454.

Mele, M., Serra, A., Buccioni, A., Conte, G., Pollicardo, A., & Secchiari, P. (2008). Effect of soybean oil supplementation on milk fatty acid composition from Saanen goats fed diets with different forage: concentrate ratios. *Italian Journal of Animal Science*, 7(3), 297–312.

Mensink, R.P. y Katan, M.B. (1990). Effect of dietary trans fatty acids on high-density and lo-density lipoprotein cholesterol levels in health subjects. *New England Journal of Medicine*, 323, 439–445.

Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., & Fonty, G. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development*, 41(2), 187–194.

Mika, A., Stepnowski, P., Kaska, L., Proczko, M., Wisniewski, P., Sledzinski, M., y Sledzinski, T. (2016). A Comprehensive study of serum odd- and branched-chain fatty acids in patients with excess weight. *Obesity*, 24, 1669–1676.

Moallem, U. 2018. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101(10):8641–8661.

Mohammed, R., Kennelly, J. J., Kramer, J. K. G., Beauchemin, K.A., Stanton, C.S., y Murphy, J.J. (2010). Effect of grain type and processing method on rumen fermentation and milk rumenic acid production. *Animal*, 4, 1425–1444.

Mosley, E.E., Dagger, B.S., Moate, P.J., y McGuire, M.A. (2006). *Cis-9, trans-11* conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition*, 136, 570–575.

Motard-Belanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P. y Lamarche, B. (2008). Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 593–599.

Mozaffarian, D. , Otto, M.C.D, Lemaitre, R.N., Fretts, A.M, Hotamisligil, G., Tsai, M.Y., Siscovick, D.S. y Nettleton, J.A. (2013). *Trans*-palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 854–861.

- Mozaffarian, D., Cao, H., King, I.B., Lemaitre, R.N., Song, X., Siscovick, D.S. y Hottel, G.S. (2010). *Trans*-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study. *Annals of Internal Medicine*, 153, 790–799.
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. y Willett, W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 354, 1601-1613.
- Nestel, P. (2014) Trans Fatty Acids: Are its cardiovascular risks fully appreciated? *Clinical Therapeutics*, 36, 315-321.
- Nudda, A., Battacone, G., Boaventura Neto, O., Cannas, A., Francesconi, A. H. D., Atzori, A. S., & Pulina, G. (2014). Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(8), 445-456.
- Ollier, S., Leroux, C., De la Foye, A., Bernard, L., Rouel, J., & Chilliard, Y. (2009). Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5544-5560.
- OMS/WHO (2004). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias Comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales.
- OMS/WHO (2010). Food and agriculture organization (FAO)/World health organization (WHO). Fats and fatty acids in human nutrition; report of an expert consultation. Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Or-Rashid, M.M., Odongo, N.E., y McBride, B.W. (2007). Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *Journal of Animal Science*, 85, 1228–1234.
- Or-Rashid, M.M., Wright, T.C., y McBride, B.W. (2009). Microbial fatty acid conversion within the rumen and the subsequent utilization of these fatty acids to improve the healthfulness of ruminant food products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 1033-1043.
- Otto, M.C.D., Nettleton, J.A., Lemaitre, R.N., Steffen, L.M., Kromhout, D., Rich, S.S., Tsai, M.Y., Jacobs, D.R., y Mozaffarian, D. (2013). Biomarkers of dairy fatty acids and risk of cardiovascular disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*, 2, e000092.
- Palmquist, D.L. (2006). Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. En: *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 2, Lipids, 3ª edición, Fox P.F. y McSweeney, P.L.H. eds. Springer, Nueva York, EE.UU, pp. 43-92.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., y Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- Parodi, P. (2006). Nutritional significance of milk lipids. In: *Advanced Dairy Chemistry Lipids*, volume 2, 3rd edition; Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H. eds.; Springer, New York, USA; pp. 601-640.

Patel, M., Wredle, E., y Bertilsson, J. (2013). Effect of dietary proportion of grass silage on milk fat with emphasis on odd- and branched-chain fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 390-397.

Penedo, L.A., Nunes, J.C., Gama, M.A., Leite, P.E., Quirico-Santos, T.F. y Torres, A.G.. (2013). Intake of butter naturally enriched with cis9, trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 2144-2151.

Pfeuffer, M., y Jaudszus, A. (2016). Pentadecanoic and heptadecanoic acids: multifaceted odd-chain fatty acids. *Advances in Nutrition*, 7, 730-734.

Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M., y Erdman, R.A. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9 containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 132, 1235-1241.

Plourde, M., Destailats, F., Chouinard, P.Y., y Angers, P. (2007). Conjugated α -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *Journal of Dairy Science*, 90, 5269-5275.

Ran-Ressler R.R., Khailova, L., Arganbright, K.M., Adkins-Rieck, C.K., Jouni, Z.E., Koren, O., Ley, R.E., Brenna, J.T., y Dvorak, B. (2011). Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLoS ONE*, 6, e29032.

Ran-Ressler, R.R., Bae, S., Lawrence, P., Wang, D. H., y Brenna, J.T. (2014). Branched-chain fatty acid content of foods and estimated intake in the USA. *British Journal of Nutrition*, 112, 565-572.

Ran-Ressler, R.R., Devapatla, S., Lawrence, P., y Brenna, J.T. (2008). Branched chain fatty acids are constituents of the normal healthy newborn gastrointestinal tract. *Pediatric Research*, 64, 605-609.

Reynolds, C.M. y Roche, H.M. (2010). Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 82, 199-204.

Risérus, U., y Marklund, M. (2017). Milk fat biomarkers and cardiometabolic disease. *Current Opinion in Lipidology*, 28, 46-51.

Roy, A., A. Ferlay, K.J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on *trans*-C-18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science* 82:479-492.

Sackmann, J.R., Duckett, S.K., Gillis, M.H., Realini, C.E., Parks, A.H., y Eggelston, R.B. (2003). Effects of forage and sunflower oil levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *Journal of Animal Science*, 81, 3174-3181.

Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J. J., & St-Pierre, N. R. (2008). Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*, 2(8), 1203-1214.

- Schmidely, P., Glasser, F., Doreau, M., Sauvant, D. (2008). Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal*, 2, 677–690.
- Schroeder, M., y Vetter, W. (2013). Detection of 430 Fatty acid methyl esters from transesterified butter sample. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 90, 771-790.
- Scollan, N. D., D. Dannenberger, K. Nuernberg, I. Richardson, S. MacKintosh, J. F. Hocquette, and A. P. Moloney. 2014. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 97(3):384-394.
- Shi, H.B., Wu, M., Zhu, J.J., Zhang, C.H., Yao, D.W., Luo, J., y Looor, J.J. (2017). Fatty acid elongase 6 plays a role in the synthesis of long-chain fatty acids in goat mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 100, 4987-4995.
- Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: B. Sels, A. Philippaerts (Eds.) *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils*. Royal Society of Chemistry, London, UK; pp 1-64.
- Shingfield, K. J., Bonnet, M., & Scollan, N. D. (2013). Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal*, 7(s1), 132-162.
- Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., & Givens, D. I. (2008). Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 606, 3-65.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4(7):1140-1166.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjarvi, V. Toivonen, A. Arola, K. V. V. Nurmela, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science* 77:165-179.
- Shingfield, K.J., Reynolds, C.K., Lupoli, B., Toivonen, V., Yurawecz, M.P., Delmonte, P., Griinari, J.M., Grandison, A.S., y Beever, D.E. (2005). Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Animal Science*, 80, 225–238.
- Shingfield, K.J., y Wallace, R.J. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. En: *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils*, Sels, B. y Philippaerts, A. eds. Royal Society of Chemistry, Londres, Reino Unido, pp. 1-64.
- Shokryzadan, P., Rajion, M.A., Meng, G.Y., Boo, L.J., Ebrahimi, M., Royan, M., Sahebi, M., Azizi, P., Abiri, R., y Jahromi, M.F. (2017). Conjugated linoleic acid: A potent fatty acid linked to animal and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2737-2748.
- Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233(6):674-688.

- Sofi, F., Buccioni, A., Cesari, F., Gori, A.M., Minieri, S., Mannini, L., Casini, A., Gen-sini, G.F., Abbate, R. y Antongiovanni, M. (2010). Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: A dietary intervention study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 20, 117–124.
- Soják, L., J. Blaško, R. Kubinec, R. Górová, A. H. Szabó, P. Májek, and M. Marge-tín. 2015. Time-dependent changes in milk fatty acid composition of ewes fed a winter ration supplemented with linseed or sunflower oils. *Czech Journal of Animal Science* 60(6):268-280.
- Sun, Y. Z., S. Y. Mao, y W. Y. Zhu. 2009. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal* 4(2):210-217.
- Toral, P.G., Hervás G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M., y De la Fuente, M.A. (2010). Milk Fatty Acid Profile and dairy sheep performance in Response to diet su-pplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 93, 1655-1667.
- Tricon, S., Burdge, G.C., Jones, E.L., Russell, J.J., El-Khazen, S., Moretti, E., Hall, W.L., Gerry, A.B., Leake, D.S., Grimble, R.F., Williams, C.M., Calder, P.C. y Yaqoob, P. (2006). Effects of dairy products naturally enriched with *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 744-753.
- Vahmani, P., Meadus, W.J., Duff, P., Rolland, D.C., y Dugan, M.E.R. (2017). Comparing the lipogenic and cholesterolgenic effects of individual *trans*-18:1 isomers in liver cells. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 160-162.
- Vahmani, P., Meadus, W.J., Mapiye, C., Duff, P., Rolland, D.C., y Dugan, M.E.R. (2015b). Double bond position plays an important role in delta-9 desaturation and lipo-genic properties of trans 18:1 isomers in mouse adipocytes. *Lipids*, 50, 1253-1258.
- Vahmani, P., Meadus, W.J., Turner, T.D., Duff, P., Rolland, D.C., Mapiye, C., y Dugan, M.E.R. (2015a). Individual trans 18:1 isomers are metabolised differently and have dis-tinct effects on lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids*, 50, 195-204.
- Van Wijlen, R.P.J., y Colombani, P.C. (2010). Grass-based ruminant production meth-ods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. *International Dairy Journal*, 20, 433-448.
- Vargas-Bello-Perez, E. and P. C. Garnsworthy. 2013. Trans fatty acids and their role in the milk of dairy cows. *Ciencia E Investigacion Agraria* 40(3):449-473.
- Vazirigohar, M., Dehghan-Banadaky, M., Rezayazdi, K., Nejati-Javaremi, A., Mir-zaei-Alamouti, H., y Patra, A.K. (2018). Effects of diets containing supplemental fats on ruminal fermentation and milk odd- and branched-chain fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 6133-6141.

- Viladomiu, M., Hontecillas, R., y Bassaganya-Riera, J. (2016). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, 785, 87-95.
- Vlaeminck, B., Gervais, R., Rahman, M.M., Gadeyne, F., Gorniak, M., Doreau, M., y Fievez, V. (2015). Postruminal synthesis modifies the odd- and branched chain fatty acid profile from the duodenum to milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 4829-4840.
- Vlaeminck, B., Dewhurst, R.J., Demeyer, D., y Fievez, V. (2004). Odd and branched chain fatty acids to estimate proportions of cellulolytic and amylolytic particle associated bacteria. *Journal of Animal Feed Science*, 13, 235-238.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd-and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3), 389-417.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Demeyer, D., y Dewhurst, R. J. (2006b). Effect of forage: concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2668-2678.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., van Laar, H., Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., y Dewhurst, R.J. (2006a). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 389-417.
- Vlaeminck, B., Gervais, R., Rahman, M. M., Gadeyne, F., Gorniak, M., Doreau, M., & Fievez, V. (2015). Postruminal synthesis modifies the odd-and branched-chain fatty acid profile from the duodenum to milk. *Journal of Dairy Science*, 98(7): 4829-4840.
- Wanders, A.J., Zock, P.L y Brouwer IA (2017). Trans fat intake and its dietary sources in general populations worldwide: A systematic review. *Nutrients*, 9, 840.
- Wang, D.H., Ran-Ressler, R., St Leger, J., Nilson, E., Palmer, L., Collins, R., y Brenna, J.T. (2018). Sea lions develop human-like vernix caseosa delivering branched fats and squalene to the GI tract. *Scientific Reports*, 8, 7478.
- Wang, X.F., Gupta, J., Kerslake, M., Rayat, G., Proctor, S.D. y Chan, C.B. (2016). *Trans*-11 vaccenic acid improves insulin secretion in models of type 2 diabetes in vivo and in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 846-857.
- Wang, Y., Jacome-Sosa, M.M., Ruth, M.R., Lu, Y., Shen, J., Reaney, M.J., Scott, S.L., Dugan, M.E.R., Anderson, H.D., Field, C.J., Proctor, S.D. y Vine, D.F. (2012). The intestinal bioavailability of vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ in a rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 1234-1246.
- Whitlock, L. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. F. Kalscheur, R. J. Baer, N. Ramaswamy, and K. M. Kasperon. 2002. Fish oil and extruded Soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85(1):234-243.

- Wongtangtintharn, S., Oku, H., Iwasaki, H., Inafuku, M., Toda, T., y Yanagita, T. (2005). Incorporation of branched-chain fatty acid into cellular lipids and caspase in dependent apoptosis in human breast cancer cell line, SKBR-3. *Lipids in Health and Disease*, 4, 29.
- Wongtangtintharn, S., Oku, H., Iwasaki, H., Toda, T. (2004). Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 50(2), 137-143.
- Woo, A. H., & Lindsay, R. C. (1984). Concentrations of major free fatty acids and flavor development in Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 960-968.
- Xu, H.F., Luo, J., Zhao, W.S., Yang, Y.C., Tian, H.B., Shi, H.B., y Bionaz, M. (2016). Overexpression of SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) promotes de novo fatty acid synthesis and triacylglycerol accumulation in goat mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 99, 783-795.
- Yakoob, M.Y., Shi, P.L., Willett, W.C., Rexrode, K.M., Campos, H., Orav, E.J., Hu, F.B., y Mozaffarian, D. (2016). Circulating biomarkers of dairy fat and risk of incident diabetes mellitus among men and women in the United States in two large prospective cohorts. *Circulation*, 133, 1645-1654.
- Yan, Y., Wang, Z., Greenwald, J., Kothapalli, K.S.D., Park, H.G., Liu, R., Mendralla, E., Lawrence, P., Wang, X., y Brenna, J.T. (2017). BCFA suppresses LPS induced IL-8 mRNA expression in human intestinal epithelial cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 116, 27-31.
- Yan, Y., Wang, Z., Wang, D., Lawrence, P., Wang, X., Kothapalli, K.S.D., Greenwald, J., Liu, R., Park, H.G., y Brenna, J.T. (2018). BCFA-enriched vernix-monoacylglycerol reduces LPS-induced inflammatory markers in human enterocytes in vitro. *Pediatric Research*, 83, 874-879.
- Yang, B., Chen, H.Q., Stanton, C., Ross, R.P., Zhang, H., Chen, Y.Q. y Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15, 314-325.
- Yang, S. L., D. P. Bu, J. Q. Wang, Z. Y. Hu, D. Li, H. Y. Wei, L. Y. Zhou, y J. J. Looor. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* 3(11):1562-1569.
- Yang, Z., Liu, S., Chen, X., Chen, H., Huang, M., y Zheng, J. (2000). Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Research*, 60, 505-509.
- Zhang, Y., Liu, K., Hao, X., y Xin, H. (2017). The relationships between odd- and branched-chain fatty acids to ruminal fermentation parameters and bacterial populations with different dietary ratios of forage and concentrate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101, 1103-1114.



