

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**IMPLICACIONES DIGESTIVAS Y METABOLICAS DEL
CONSUMO DE ALMIDÓN RESISTENTE EN EL CERDO**

MEMÒRIA PRESENTADA PER DANIEL MARTÍNEZ PUIG
PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DINS DEL PROGRAMA DE
DOCTORAT DE PRODUCCIÓ ANIMAL DEL DEPARTAMENT DE CIÈNCIA
ANIMAL I DELS ALIMENTS

BELLATERRA, 2006



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

José F. Pérez Hernández, professor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la memòria titulada “IMPLICACIONES DIGESTIVAS Y METABOLICAS DEL CONSUMO DE ALMIDÓN RESISTENTE EN EL CERDO” presentada per Daniel Martínez Puig per optar al grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritza la seva presentació per tal que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signa la present a Bellaterra, a 7 de març de 2006.

Dr. José F. Pérez Hernández

La realització de la present tesis doctoral ha estat possible gràcies al finançament del projecte CYCIT AGF98-0506 y CYCIT AGL2001-2621-CO2-01.

A en Gil,

AGARÍMENTS

És habitual que la memòria d'una tesi doctoral comenci donant gràcies a tot aquell qui amb la seva ajuda i suport ha fet possible que es dugui a terme. No obstant, quan la realització de la tesi es perllonga en el temps (en aquest cas des del 2000 fins al 2006), i especialment quan part d'aquesta tesi es fa treballant fora de la universitat, és normal que la llista de persones a agrair i també la intensitat de l'agraïment es multipliqui de manera exponencial.

Acabar la tesi 3 anys després de marxar de la universitat vol dir que hi ha hagut algú, en aquest cas en Francisco, que ha tingut la paciència i capacitat de convicció suficient per fer-me creure que acabar era possible. I no solsament això, sóc conscient que sense la seva actitud: sempre disponible, sempre a punt per donar una resposta ràpida, la tesi s'hauria pogut prolongar potser de manera indefinida.

També vull agrair la col·laboració de la resta de professors de la unitat de Nutrició: en Josep, la Mariola, l'Ana Cris, la Roser i també la Susana, tots ells fonamentals. I no em puc ni vull oblidar de tots els becaris amb qui vaig compartir l'inici d'aquesta etapa: en Sigfrid, l'Imed, la Lucía, en Jaume, en Joaquin (aquests 2 últims fins i tot companys de pis a Ciutat Badia), ni tampoc els becaris que van anar arribant després: l'Edgar i la Ceci, la Montse (hereva del meu pupitre), la Marisol, l'Eva, l'Alba, en Gabri i tots els becaris que hi ha actualment (ja em disculpareu però sóc dolent pels noms).

Voldria dedicar també una línia a l'Olga, per les seves qualitats humanes excepcionals, així com als estudiants de doctorat atípics: en Francesc Baucells, en Raúl Miazso i la Xomaira.

Però si sortim de Nutrició, sense deixar la facultat de veterinària, trobarem moltes persones que també mereixen el meu agraïment: des de la gent del Cresa (en Miquel, en Quim Segalés, la Natàlia), fins a la gent de cirurgia (l'Anna Andaluz i en Felix) passant per repro amb en Joan, per bioquímica amb en Sergio, per bioquímica clínica amb la Yolanda, per patologia amb en Jordi Muntaner i per producció amb en Blas, en Paul, en Sergi i l'Alfred. Tampoc em voldria oblidar de la gent de les granges experimentals: en Ricard (company d'esquaix), en Ramon, en Manel, en Manolo i en Vale.

I si sortim de veterinària
importants per l'evolució de
l'Alba Eustaquio).

B, trobarem persones tan
l'Anàlisi Química (entre ells

No obstant també hi ha hagut gent de fora que ha col·laborat directament: el Dr. Jacques Mouroit del INRA de St. Gilles i els Drs. Veronique Ferchaut-Roucher i Michel Krempf del Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes.

Encara que no han col·laborat de manera tan directa, també vull manifestar el meu sincer agraïment als companys de l'empresa on treballava abans (Hipra), especialment en Ricard March, en Jaime Maldonado, en Dani Torrent, en Xevi, l'Oriol, en Joan, en Soler, en Gifre, la Rosa, en Toni, la Reina, la Carme, la Miriam i en Carlos Artigas; i també als companys de la meua empresa actual (Bioiberica): en Carles, l'Eli, en Jaume, la Cristina, en Toni Garcia, en Roger, en Carlos-Raul, en Toni Marques, en Ramón, la Carmen, l'Anna Torrent, en Rafa, l'Anna Botta, en Manel, la Núria, en Xevi, en Joan, en Josep (sóc conscient que me'n deixo moltíssims).

Finalment, ja fora de l'àmbit professional, també vull retre un breu homenatge a les persones imprescindibles: els meus pares, i també la resta de la meua família i els meus amics (en Pep, en Marçal, l'Auma, l'Homs i tota la colla). Dec estar molt tot perquè fins i tot em recordo dels sogres...

I no podria acabar d'altra manera que recordant a la persona que motiva pràcticament tot el que faig, la Clara.

RESUMEN

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general evaluar las principales consecuencias digestivas y metabólicas del consumo de almidón resistente en cerdos en crecimiento.

Para la consecución de este objetivo se diseñaron tres experimentos. En el primero de ellos se utilizaron un total de 12 cerdos divididos en 2 grupos, que fueron alimentados con dos dietas que diferían el tipo de almidón añadido (25%), siendo de maíz en una (dieta AM) y crudo de patata (dieta ACP) en la otra, como ejemplos de almidón digestible y almidón resistente tipo II. Las raciones experimentales se administraron de forma restringida (al 90% de la ingestión voluntaria estimada) durante un periodo de 38 días, que llevó a los animales hasta un peso aproximado de 54 kg.

El segundo experimento se realizó simultáneo al primero. Se utilizaron 6 cerdos divididos en 2 grupos y alimentados con las mismas dietas que se utilizaron en la primera prueba experimental. Después de recibir las dietas experimentales durante un periodo de 28 días, los animales fueron canulados en vena safena y arteria femoral, y recibieron una infusión constante de 1-¹³C acetato y de 6,6-D₂ glucosa, con el fin de estudiar posibles variaciones en el ritmo de aparición en sangre periférica de glucosa y acetato, así como en la concentración plasmática de glucosa e insulina posprandial.

En la tercera prueba se utilizaron 16 cerdos también divididos en 2 grupos y alimentados con 2 dietas: una contenía almidón de maíz (AM) y la otra almidón crudo de patata (ACP). En esta prueba los animales fueron alimentados *ad libitum* durante 14 semanas con el fin de estudiar el impacto de la ingestión de almidón resistente durante un periodo de tiempo prolongado. Durante las primeras 8 semanas las dietas contenían un 25% de almidón añadido y durante las 6 siguientes el porcentaje aumentó hasta el 35%.

Respuestas del tracto digestivo

En todas las pruebas la administración de almidón resistente provocó una disminución inicial en la digestibilidad total de la materia orgánica (MO), que no se compensó hasta después de 38 y 45 días de adaptación, en la primera y tercera prueba respectivamente. El descenso en la digestibilidad de la MO no fue consecuencia de

una mayor excreción fecal de almidón, ya que en los primeros controles experimentales (a 9 y 11 días) la excreción fecal del almidón era igual entre tratamientos. La digestibilidad de la MO estuvo parcialmente explicada por un incremento en la excreción fecal de proteína microbiana. En la primera prueba, se observó que la mayor excreción de N por vía fecal (14.6 vs. 9.8 g/d; $P<0.05$) quedó compensada por una menor excreción de N por vía urinaria (15.2 vs. 20.5 g/d; $P>0.05$). Además, en la tercera prueba se determinó que el descenso en la digestibilidad de la MO también se explicaba parcialmente por una mayor excreción fecal de fibra neutro detergente (101.3 vs. 76.7 g/d; $P<0.05$).

Tanto en la primera como en la tercera prueba la digestibilidad ileal del almidón fue inferior ($P<0.05$) en la dieta que contenía ACP respecto a la dieta que contenía AM (75% vs. 95% de media). El mayor flujo de almidón al tracto digestivo posterior en la dieta ACP provocó una hipertrofia del intestino grueso, determinada por un mayor peso y longitud del colon ($P<0.05$).

En la primera prueba, la fermentación de almidón en colon proximal estuvo asociada a un incremento en la concentración de bases púricas (BP) y ácidos grasos volátiles (AGV). En cambio, en la tercera prueba, con los animales sacrificados con un mayor peso (93kg), aunque la fermentación de almidón también se localizó en colon proximal, no estuvo asociada a incrementos en la concentración local de BP ni AGV. No obstante, si que se observaron cambios en el patrón de fermentación respecto a la dieta AM, determinados por un incremento en la producción de butirato. En la tercera prueba la proporción de butirato en la digesta de colon proximal, fue un 80% superior en el tratamiento ACP respecto al AM ($P<0.05$), mientras que en la primera prueba solamente se había registrado una diferencia del 40% entre tratamientos ($P>0.05$). Estos resultados indican que entre las 5 y 14 semanas se produjo una adaptación de la flora intestinal al substrato, que resultó en una disminución en la proliferación y actividad bacteriana debido a la selección de una flora amilolítica más eficiente, que se caracterizó por la producción de butirato. Así pues, después de 14 semanas, los animales alimentados con la dieta ACP presentaban un perfil filogenético de la flora intestinal diferente de los alimentados con la dieta AM, y tendían a presentar una mayor biodiversidad ($P=0.07$).

Entre las consecuencias del incremento en la producción de butirato, observado en los animales de acabado (prueba 3), cabe destacar la reducción del número de apoptosis por cripta (0.68 vs. 0.38; $P<0.05$) observado en la mucosa del colon proximal. Esta

reducción no estuvo asociada a un incremento en la profundidad de las criptas de la mucosa, sino al contrario: la profundidad de las criptas fue inferior en el tratamiento ACP respecto al AM (416 vs. 430 μm ; $P < 0.05$), lo que sugiere que la proliferación celular estuvo reducida en el tratamiento de ACP respecto al AM.

Respuestas metabólicas

En la primera prueba, después de 38 días de administración de las dietas experimentales, se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de tejidos adiposos y musculares con el fin de estudiar el impacto de la administración de almidón resistente sobre la actividad enzimática de los enzimas relacionados con la lipogénesis (ACX, ME, G6PDH) y el contenido de grasa intramuscular. La administración de almidón resistente provocó una disminución en la actividad enzimática de todos los enzimas estudiados ($P < 0.05$) en los tejidos adiposos subcutáneo y abdominal, pero no modificaron la actividad de los enzimas lipogénicos de los tejidos musculares ni el contenido de grasa intramuscular.

En la tercera prueba, tras 97 días de administración de las dietas experimentales con un régimen de alimentación ad libitum, se observó que a diferencia del primer experimento, la administración de almidón resistente inducía un descenso en el contenido de grasa intramuscular (62.7 vs. 44.0 g/kg MS en longissimus dorsi; $P < 0.05$).

Los resultados obtenidos en el segundo experimento, aportaron una posible explicación para justificar las diferencias en la actividad de los enzimas lipogénicos observados tras la administración de almidón resistente. Los cerdos alimentados con almidón crudo de patata presentaron menores concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina, así como un menor ritmo de entrada de glucosa en sangre periférica. Sin embargo no se detectaron diferencias en el ritmo de entrada de acetato. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual la administración de almidón resistente condiciona la actividad de los enzimas lipogénicos, puede ser a través de su impacto en la glicemia e insulinemia posprandiales.

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la administración de almidón resistente afecta el sistema gastrointestinal, promoviendo la aparición de mecanismos de adaptación digestiva en respuesta al aporte de almidón a intestino grueso, pero también afecta al metabolismo general del animal, ya que produce variaciones en el

ritmo de aparición y concentración de glucosa e insulina plasmática y en consecuencia modifica la lipogénesis.

INDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODU	15
CAPÍTULO 2 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. EL ALMIDÓN EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES MONOGÁSTRICOS	21
2.2. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN	23
2.2.1. Estructura de los gránulos de almidón	25
2.2.2. Modificación de la estructura de los gránulos de almidón	26
2.2.3. Gelificación, retrogradación y formación de almidón resistente	27
2.3. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO	29
2.3.1. Factores intrínsecos condicionantes de la digestión del almidón	31
2.3.1.1. <u>Barreras físicas</u>	
2.3.1.1.1. <i>Tamaño de partícula</i>	31
2.3.1.1.2. <i>Matriz proteica</i>	32
2.3.1.1.3. <i>Complejos amilosa-lípidos</i>	33
2.3.1.2. <u>Estructura del almidón</u>	
2.3.1.2.1. <i>Estructura cristalina</i>	33
2.3.1.2.2. <i>Tamaño del gránulo</i>	33
2.3.1.2.3. <i>Composición del gránulo</i>	34
2.3.2. Factores extrínsecos y digestibilidad	
2.3.2.1. <u>Procesado</u>	34
2.3.2.1.1. <i>Gelatinización</i>	35
2.3.2.1.2. <i>Retrogradación</i>	35
2.3.2.1.3. <i>Modificaciones químicas</i>	36
2.3.2.2. <u>Factores dependientes del animal o del resto de la dieta</u>	36
2.3.3. Determinación del almidón resistente	

2.3.3.1. <u>Técnicas in vitro</u>	37
2.3.3.2. <u>Técnicas in vivo</u>	40
2.3.4. Consecuencias fisiológicas del almidón resistente	
2.3.4.1. <u>Tras</u>	41
2.3.4.2. <u>Índic</u>	41
2.3.4.3. <u>Almidón resistente y metabolismo lipídico</u>	44
2.4. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO GRUESO	45
2.4.1. Población microbiana	46
2.4.2. Substratos fermentables	48
2.4.3. Productos de la fermentación	52
2.4.4. Consecuencias fisiológicas del almidón resistente en intestino grueso	
2.4.4.1. <u>Efecto del almidón resistente sobre la masa fecal</u>	56
2.4.4.2. <u>Efecto del almidón resistente sobre la biodisponibilidad de minerales</u>	57
2.4.4.3. <u>El almidón resistente como prebiótico</u>	58
2.4.4.4. <u>Metabolismo de los ácidos grasos volátiles</u>	58
2.4.4.5. <u>Efectos de los ácidos grasos volátiles</u>	
2.4.4.5.1. <i>Acetato</i>	60
2.4.4.5.2. <i>Propionato</i>	61
2.4.4.5.3. <i>Butirato</i>	62
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	67
CAPÍTULO 4 - Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs.	71
4.1. INTRODUCTION	72
4.2. MATERIAL AND METHODS	73
4.2.1. Animals and diets	73
4.2.2. Experimental procedures	73
4.2.3. Analytical procedures	75
4.2.4. Calculations and statistical analysis	75
4.3. RESULTS	
4.3.1. Animal health and production	75
4.3.2. Digestibility and urinary N excretion	76

4.3.4. Purine base and short chain fatty acid concentrations in feces	77
4.3.5. Digestive t	77
4.4. DISCUSSION	81
4.5. REFERENCES	85
 CAPÍTULO 5 - Long-term effects of feeding large amounts of resistant starch on the digestive tract of growing pigs.	93
5.1. INTRODUCTION	94
5.2. MATERIAL AND METHDS	95
5.2.1. Animals and diets	95
5.2.2. Experimental procedures	97
5.2.3. Analytical procedures	97
5.2.4. Statistical analysis	99
5.3. RESULTS	99
5.3.1. Digestibility measurements	100
5.3.2. Microflora and fermentation characteristics	102
5.3.3. Large bowel morphology	106
5.4. DISCUSSION	106
5.5. REFERENCES	110
 CAPÍTULO 6 - Consumption of resistant starch decreases lipogenesis in adipose tissues but not in muscular tissues of growing pigs.	119
6.1. INTRODUCTION	120
6.2. MATERIAL AND METHODS	121
6.2.1. Experiment 1	
6.2.1.1. <u>Animals and diets</u>	121
6.2.1.2. <u>Analytical procedures</u>	122
6.2.2. Experiment 2	
6.2.2.1. <u>Animals and diets</u>	123
6.2.2.2. <u>Tracer infusions</u>	123
6.2.2.3. <u>Analytical procedures and calculations</u>	
6.2.2.3.1. <i>Glucose and acetate analyses</i>	124
6.2.2.3.2. <i>Rate of glucose appearance in the systemic pool</i>	125

6.2.2.3.3. <i>Rate of acetate appearance in the systemic</i>	125
6.2.3. Statistical	125
6.3. RESULTS	
6.3.1. Experiment 1	126
6.3.2. Experiment 2	
6.3.2.1. <u>Peripheral glucose responses</u>	128
6.3.2.2. <u>Peripheral insulin responses</u>	131
6.3.2.3. <u>Peripheral acetate responses</u>	131
6.4. DISCUSSION	132
6.5. REFERENCES	135
 CAPÍTULO 7 - Anexo 1: Evolución del peso vivo y contenido de grasa intramuscular de cerdos alimentados con dietas de almidón de maíz y almidón crudo de patata durante los periodos de crecimiento y acabado	143
7.1. INTRODUCCIÓN	143
7.2. MATERIAL Y MÉTODOS	143
7.2.1. Animales y dietas	144
7.2.2. Procedimientos experimentales	144
7.2.3. Procedimientos analíticos	144
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
7.4. BIBLIOGRAFIA	147
 CAPÍTULO 8 - DISCUSIÓN GENERAL	151
8.1. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO	152
8.2. CONSECUENCIAS DE LA DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO	154
8.3. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO GRUESO	156
8.4. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DIGESTIVA	159
8.5. CONSECUENCIAS DE LA FERMENTACIÓN DE ALMIDÓN RESISTENTE	163
 CAPÍTULO 9 – CONCLUSIONES	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. – Estructura básica de l.	23
Fig. 2.2. – Fotografías de los grá scanning (maíz, patata, guisante)	25
Fig. 2.3. – Modelo de la disposición de la amilopectina en el almidón de patata	26
Fig. 2.4. – Patrón de actuación de los enzimas hidrolíticos sobre la amilosa y amilopectina.	30
Fig. 2.5. – Esquema del método de Englyst para la determinación de almidón resistente.	39
Fig. 2.6. – Concentración arterial y portal de la glucosa plasmática en cerdos después de la ingestión de una ración que contenía almidón de maíz o de guisante.	43
Fig. 2.7. – Esquema de los posibles productos obtenidos a partir de la fermentación de una unidad de glucosa.	51
Fig. 4.1. – Daily excretion of N in the urine of growing pigs fed a diet containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg of raw potato starch.	77
Fig. 4.2. – Purine bases (A) and short-chain fatty acids (SCFA) concentration (B) in the feces of growing pigs fed a diet containing 250 g/kg of either corn starch or raw potato starch.	78
Fig. 4.3. – Fractional digestibility of starch in ileal, caecal, middle colonic and rectal digesta of growing pigs fed on diets containing 250 g/kg of either corn starch or raw potato starch.	78
Fig. 4.4. – Purine base (A) and SCFA (B) concentration in the large bowel of pigs fed on diets containing 250 g/kg of either corn starch (Diet CS) or raw potato starch	81
Fig. 5.1. – Fractional digestibility of starch (A) and NDF (B) in ileal. caecal. proximal- middle- and distal-colonic and rectal digesta of growing pigs fed on diets containing either corn starch or raw potato starch	101
Fig. 5.2. – Ecological changes in microbial population measured by RFLP.	105
Fig. 6.1. – Plasma glucose (A) and rate of glucose appearance (B) increments in the systemic pool after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg of raw potato starch.	130
Fig. 6.2. – Plasma insulin increments in arterial plasma after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg of raw potato starch	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. – Composición de los ingredientes de la dieta y lignina de los principales ingredientes utilizados en la alimentación porcina.	22
Tabla 2.2. – Propiedades de los gránulos de almidón de materias primas utilizadas en la alimentación de animales monogástricos.	24
Tabla 2.3. – Enzimas que participan en la hidrólisis del almidón.	29
Tabla 2.4. – Clasificación de almidones resistentes.	31
Tabla 2.5. – Peso de los compartimentos del tracto gastrointestinal posterior y digestibilidad aparente total de la MO de ratas alimentadas con raciones que contenían de 0-240 g/kg de almidón resistente de patata /kg de ración.	46
Tabla 2.6. – Pool de AGV en el colon de cerdos alimentados con alubias o arroz con cascarilla.	49
Tabla 2.7. – Producción de AGV tras 24 h de fermentación in vitro de diferentes sustratos (mmol / g sustrato).	52
Tabla 2.8. – Patrón de producción de AGV a partir de diferentes sustratos	54
Tabla 2.9. – Concentración de AGV y butirato (en paréntesis) en los diferentes compartimentos de intestino grueso de cerdos alimentados con diferentes fuentes de fibra y almidón resistente.	55
Tabla 2.10. – Cambios en variables fecales observadas en humanos alimentados con almidón resistente.	57
Tabla 2.11. – Concentraciones de AGV en colon, vena porta y sangre arterial.	60
Tabla 4.1. – Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets.	74
Tabla 4.2. – Whole-tract apparent digestibility of organic matter (OM), crude protein (CP) and starch in growing pigs fed a diet with 250g/kg of corn starch or raw potato starch.	76
Tabla 4.3. – The full and empty weight (kg) and length (m) of the digestive tract, transit time (TT; h) and the mucosa thickness (μm) in cecum and colon of pigs that ingested during 38 days a diet with 250g/kg of either corn starch or raw potato starch.	79
Tabla 4.4. – SCFA: acetate, propionate, butyrate and branched-chain short chain fatty acids (BCSCFA) profile (mol/mol) in the large bowel digesta of pigs that ingested a diet with 250 g/kg of either corn starch or raw potato starch.	80

Tabla 5.1. – Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets offered to pigs between 21 and 61 kg BW (Growing)) and between 61 and 94 kg BW (Finishing).	96
Tabla 5.2. – Whole-tract apparent digestibility of organic matter (OM), crude protein (CP), starch and neutral detergent fibre (NDF) in growing pigs fed diets containing corn starch or raw potato starch.	100
Tabla 5.3. – Fractional digestibility of calcium, phosphorus and magnesium in caecum and rectum digesta, and daily fecal excretion of sodium and potassium (mg/d) of pigs fed on diets containing either corn starch or raw potato starch.	102
Tabla 5.4. – Concentration ($\mu\text{mol/g DM}$) of purine bases (PB) and Guanine:Adenine (Gn: Ad) ratio in proximal colon and rectum digesta and enterobacteria and lactobacilli populations ($\log_{10}$ (16S rDNA gene copies / g DM)) in the caecum and rectum of pigs that ingested a diet containing either corn starch or raw potato starch.	103
Tabla 5.5. – Total SCFA concentration ($\mu\text{mol/g FM}$) and the proportions (mol/mol) of SCFA (acetate, propionate, butyrate) and branched-chain short chain fatty acids (BCFA) in the large bowel digesta of pigs that ingested a diet containing either corn starch or raw potato starch.	104
Table 5.6. - Full weight (kg) of the whole digestive tract, full and empty weight of the caecum and colon, length (m) of the small and large bowel and morphometric measurements (crypt depth and number of apoptosis) of pigs that ingested during 97 days a diet containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS)	106
Tabla 6.1. – Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets.	122
Tabla 6.2. – Backfat thickness (mm) and activity of acetyl-CoA carboxylase (ACX), malic enzyme (ME) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) determined in the adipose tissue (subcutaneous, intermuscular and abdominal) of growing pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg raw potato starch.	127
Tabla 6.3. – Intramuscular fat content (g/kg DM) and activity of acetyl-CoA carboxylase (ACX), malic enzyme (ME) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) determined in muscle tissues (longissimus thoracis, gluteus medium and longissimus dorsi) of growing pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg raw potato starch.	128

Tabla 6.4. – Area under the curve (AUC) and maximum concentration increments (MCI) of the glucose, rate of glucose appearance and insulin in plasma after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg of raw potato starch.	129
Tabla 6.5. – Concentration, isotopic enrichment (MPE) and rate of appearance of acetate in the systemic pool after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch or 250 g/kg of raw potato starch.	132
Tabla 7.1. - Composición y análisis de nutrientes de los piensos experimentales ofrecidos a los cerdos entre 21 y 61 kg de PV (Crecimiento) y entre 61 y 94 kg de PV (Acabado).	145
Tabla 7.2. - Evolución del peso vivo (kg) durante las fases de engorde y acabado de cerdos alimentados con dietas que contenían almidón de maíz (AM) o almidón crudo de patata (ACP).	146

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACP: Almidón Crudo de Patata

ACX: Acetil-CoA carboxilasa

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

AM: Almidón de maíz

AR: Almidón Resistente

BP: Bases Púricas

CHO: Carbohidratos

FB: Fibra Bruta

FND: Fibra Neutro Detergente

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

ME: Enzima málico

MO: Materia Orgánica

MS: Materia Seca

PNA: Polisacáridos no Amiláceos

PB: Proteína Bruta

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PV: Peso Vivo

TMR: Tiempo Medio de Retención

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La principal fuente de energía de las dietas de porcino son los carbohidratos, que representan entre el 70 y 80% de los componentes de la ración. El almidón es el componente mayoritario de los carbohidratos, representa entre el 60 y 80% del contenido de los cereales (Wiseman et al, 2001), y constituye el principal aporte energético de la dieta.

En los diferentes sistemas de valoración energética del ganado porcino, NRC (1998), INRA (Noblet et al, 2004), CVB (Doorenbos et al, 2004), sistema danés (Tybirk, 2004), se asume que la digestibilidad ileal del almidón es del 100%, con la única excepción del almidón crudo de patata, que en el sistema holandés (CVB) se considera totalmente indigestible en el ileon, y por lo tanto se incluye en el grupo de carbohidratos fermentables.

Sin embargo, la digestibilidad del almidón a nivel ileal no siempre alcanza el 100%, sino que depende de su procedencia botánica y procesado, así como de la madurez del sistema digestivo del animal. Por este motivo en 1992 Asp et al. introdujeron en humanos el concepto de almidón resistente, que se define como la fracción de almidón y productos de su degradación que escapan a la digestión enzimática y entran en intestino grueso donde serán fermentados.

En el caso de las dietas de porcino se ha demostrado que algunos tipos de almidón, como por ejemplo los procedentes del sorgo (Pascual-Reas et al, 1997), guisante o patata cruda (Martine et al, 1998), son parcialmente indigestibles a nivel ileal. Además, algunos tipos de procesado del pienso, también pueden generar almidones resistentes, como por ejemplo la formación de almidón retrogradado a partir de ciertas condiciones de extrusión (Jouppila et al, 1998). Las diferencias pueden ser todavía más pronunciadas si se trata de animales jóvenes, con limitaciones digestivas, como pueden ser los lechones recién destetados.

Por lo tanto, parece evidente que considerar que todo el almidón es digerido a nivel ileal es una simplificación. Sin embargo, en condiciones normales, el aporte de almidón resistente al tracto digestivo posterior del cerdo, constituye solamente una fracción menor del sustrato potencialmente fermentable.

En cuanto a sus consecuencias digestivas o metabólicas, la presencia de almidón resistente, en tanto que determina la cantidad de almidón digerido a nivel ileal, condiciona la glicemia posprandial (van der Meulen et al, 1997a) y el equilibrio

hormonal entre insulina y glucagón (Liljeberg and Bjorck, 1994), lo cual podría tener consecuencias sobre el metabolismo lipídico, ya que la actividad de las enzimas lipogénicas está regulada precisamente por la glicemia (Shillabeer et al, 1992; Towle et al, 1997) e insulinemia (Girard et al, 1997; Kabir et al, 1998). De esta forma, el almidón resistente puede influir también sobre algunas características de la calidad de la canal, como son el grado de engrasamiento o el nivel de grasa intramuscular.

El almidón no digerido entra en intestino grueso como sustrato fermentable y por lo tanto es un elemento que va a condicionar el equilibrio del ecosistema intestinal. Diversos estudios han demostrado que la introducción de materia orgánica fermentable en intestino grueso, incrementa la población bacteriana y promueve la hipertrofia intestinal (revisado por Mathers, 1991). La proliferación bacteriana, consume energía y a su vez, fija nitrógeno del medio que es susceptible de ser excretado en forma de masa bacteriana por vía fecal. En este sentido, el nivel de almidón resistente de la dieta podría tener implicaciones en la vía de excreción del nitrógeno, y en el perfil de composición de este N, entre el más lixiviable de la orina y el más estructural de las heces.

Además, los compuestos que se generan a partir de la fermentación bacteriana, básicamente ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico), son aprovechados por el animal como sustrato energético. En el caso del almidón, se ha estimado en humanos que la eficiencia energética de la fermentación es aproximadamente el 45% respecto a la hidrólisis enzimática (Livesey, 1990). Sin embargo, la liberación de ácidos grasos volátiles representa un aporte de nutrientes energéticos cuya utilización por los tejidos debe ser estudiada.

Así por ejemplo, el acetato es absorbido y mayoritariamente utilizado por los tejidos periféricos, y puede ser utilizado para la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (Yen et al, 1991). Podría plantearse estudiar su impacto sobre la lipogénesis en diferentes tejidos grasos, y en especial sobre tejidos musculares ya que se ha demostrado que es oxidado mayoritariamente por el tejido muscular (Bergman, 1990). Por su parte, el propionato es utilizado como recurso gluconeogénico, mientras que el butirato se considera el principal sustrato energético de los colonocitos (Roediger, 1980) y en consecuencia un nutriente esencial para el mantenimiento de la integridad estructural de la mucosa intestinal. Las implicaciones que el butirato puede tener sobre la integridad de la mucosa intestinal en el hombre son enormes. Las implicaciones en el animal, y en particular en el ganado porcino, no han sido descritas. Sin embargo, es

posible que su papel sea similar y pueda contribuir a preservar los mecanismos de protección frente a las patologías digestivas.

En su conjunto, los argumentos anteriormente descritos, sugieren que el aporte al tracto digestivo posterior de diferentes niveles de sustrato fermentable puede condicionar el valor energético de la dieta, y modificar los parámetros digestivos y metabólicos. En el presente estudio utilizaremos el almidón resistente como modelo del aporte de diferentes niveles de sustrato fermentable.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL ALMIDÓN EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES MONOGÁSTRICOS

Las principales materias primas utilizadas en la alimentación de monogástricos son los cereales y sus subproductos, así como las leguminosas y sus tortas de extracción. Mientras las leguminosas se introducen en los piensos como aporte proteico, los cereales aportan la mayor parte de la energía de la dieta. El componente principal de los cereales es el almidón, que se encuentra habitualmente en una proporción del 40-70% en materia seca (tabla 2.1.; Bach Knudsen, 1997). Después del almidón, los carbohidratos cuantitativamente más importantes en los cereales, son los polisacáridos no amiláceos (PNA), cuya proporción puede oscilar desde un 9.7% de la materia seca en el maíz a un 23.2% en la avena (Bach Knudsen, 1997). El resto de carbohidratos lo constituyen una fracción reducida de monosacáridos libres (0.2-0.6% de la MS) y oligosacáridos (<0.2% de la MS).

En comparación con los cereales, las semillas de leguminosas contienen una mayor proporción de azúcares de bajo peso molecular, sobretodo α -galactósidos y de PNA (120-440 g/kg), mientras que la proporción de almidón es menor. No obstante, existen importantes diferencias en la cantidad total de almidón según la especie vegetal. Los guisantes y las habas contienen niveles altos (400-500 g/kg de MS), mientras que la torta de soja y los altramuces presentan contenidos relativamente bajos de almidón (18-27 g/kg de MS) y elevados de PNA (217 y 404 g/kg de MS respectivamente) (Bach Knudsen, 1997).

En concreto, en el ganado porcino se puede afirmar que los carbohidratos son los componentes mayoritarios de las principales materias primas utilizadas en la alimentación, constituyendo generalmente más del 70% de la materia seca (Patridge, 1993). Entre estos carbohidratos, que tienen como destino metabólico el aporte de energía, el almidón es el que cuantitativamente tiene un peso más importante, lo que justifica su papel central en la fisiología digestiva y el metabolismo energético del animal.

Tabla 2.1. – Composición (g kg⁻¹) de carbohidratos (CHO) y lignina de los principales ingredientes utilizados en la alimentación porcina. (Bach Knudsen, 1997)

Ingrediente	CHO total ¹	<u>Azúcares</u>			Almidón	PNA		Lignina
		Mon. ²	Sac. ³	α-gal. ⁴		Celulos	PNC	
						a	⁵	
Cereales								
Maíz	823	4	13	3	690	22	75	11
Trigo	823	3	11	6	651	20	99	19
Cebada	834	4	12	6	587	43	144	35
Centeno	850	6	19	7	613	16	136	21
Avena	787	2	11	5	468	82	150	66
Leguminosas								
Soja	400	7	70	60	27	62	155	16
Guisante	735	9	30	50	454	53	127	12
Altramuz	534	5	24	77	14	131	271	12
Haba	705	5	27	54	407	81	109	20

¹Total CHO: incluye el total de carbohidratos y la lignina

²Mon.: monosacáridos libres

³Sac.: sacarosa

⁴α-gal: oligosacáridos de galactosa α-galactósidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa)

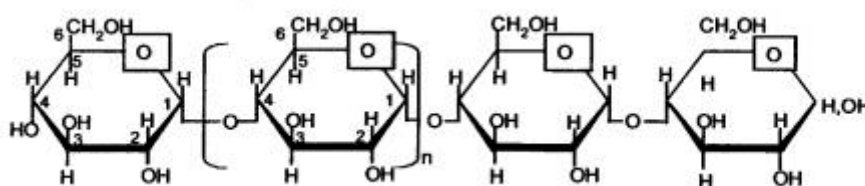
⁵PNC: polisacáridos no celulósicos

2.2. ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN

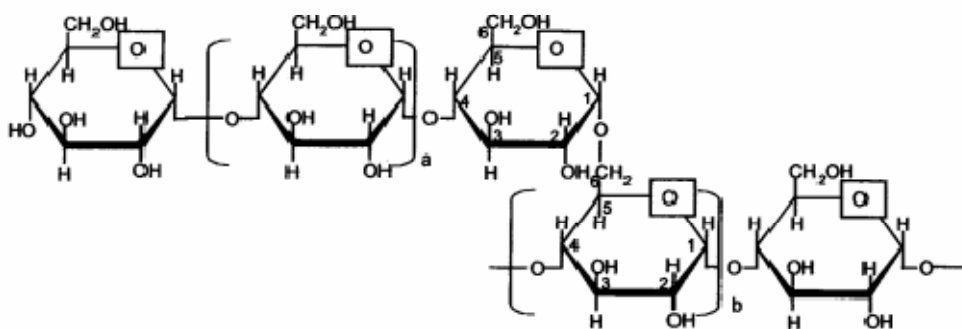
El almidón es el polisacárido de reserva de las plantas más importante y probablemente el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Hizukuri, 1996). Básicamente, se trata de un homopolisacárido de glucosa presente en las plantas en forma de gránulos compactados parcialmente cristalinos, cuyo tamaño, forma y temperatura de gelatinización depende de su procedencia botánica (Tabla 2.2.). Después de la disgregación y disolución de estos gránulos, la mayoría de almidones pueden fraccionarse en 2 componentes: amilosa y amilopectina.

La amilosa (figura 2.1.) es una molécula esencialmente lineal, con un peso molecular entre $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ (Tester et al, 2004), en que las unidades de D-glucosa (entorno a 1000) están unidas mayoritariamente ($\sim 99\%$) por enlaces glucosídicos $\alpha(1 \rightarrow 4)$ con una pequeña fracción ($\sim 1\%$) de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

Figura 2.1. – Estructura básica de la amilosa y amilopectina



Amilosa: cadena de glucano α -(1, 4); promedio de $n=1000$ unidades de glucosa. La cadena lineal puede contener ocasionalmente ramificaciones α -(1, 6).



Amilopectina: Puntos de ramificación α -(1, 6). Para las cadenas exteriores $a=12-23$ unidades de glucosa. Para las cadenas interiores $b=20-120$ unidades de glucosa. Tanto a como b pueden variar de acuerdo con el origen botánico.

La amilopectina (figura 2.1.) es una molécula de mayor tamaño que la amilosa (peso molecular entre $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$), formada también por monómeros de D-glucosa (entre 12 y 120) unidos en un ~95% por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$ y con aproximadamente un 5% de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ que le confieren una estructura más ramificada.

La amilopectina es el componente mayoritario de la mayoría de almidones. Según su contenido en amilosa y amilopectina, los almidones se definen como waxy (cereos) cuando la relación amilosa : amilopectina es baja (entorno al 15%). Los valores normales de amilosa representan entre el 16 y 35% (Tabla 2.2.). Cuando la amilosa excede el 36% se considera que el almidón contiene un nivel elevado de amilosa. Las variedades waxy de cebada, maíz y arroz son comúnmente disponibles, mientras que más recientemente han aparecido también para el trigo y la patata. También se ha incrementado recientemente la disponibilidad de variedades ricas en amilosa, sobretodo procedentes del maíz.

Tabla 2.2. – Propiedades de los gránulos de almidón de materias primas utilizadas en la alimentación de animales monogástricos.

Fuente	Forma de gránulo	Tamaño de granulo (μm)	Contenido en amilosa (%)
Maíz waxy	Redondo	5-25	1
Maíz	Redondo o lenticular	5-25	28
Avena	Polihédrico	5-10	23-24
Arroz	Poligonal	3-8	17-19
Haba	Oval	30	24
Trigo	Redondo o lenticular	2-35	23-27
Sorgo	Redondo	15-35	23-28
Patata	Oval	15-100	23

Fuente: FAO 1998

En los almidones purificados, la humedad varía entre el 10 y 18% dependiendo de la fuente, situándose los procedentes de cereales en el límite inferior y los procedentes de tubérculos en el superior. Solamente los almidones de cereales contienen lípidos (~1.5% del gránulo; Morrison, 1993), y su contenido está correlacionado positivamente con el contenido en amilosa. Los lípidos están totalmente ligados a parte de la amilosa, lo cual afecta la estructura y funcionalidad de los gránulos de almidón (discutido más adelante). Los lípidos del almidón comprenden ácidos grasos libres y fosfolípidos en diferentes proporciones dependiendo de la fuente de almidón.

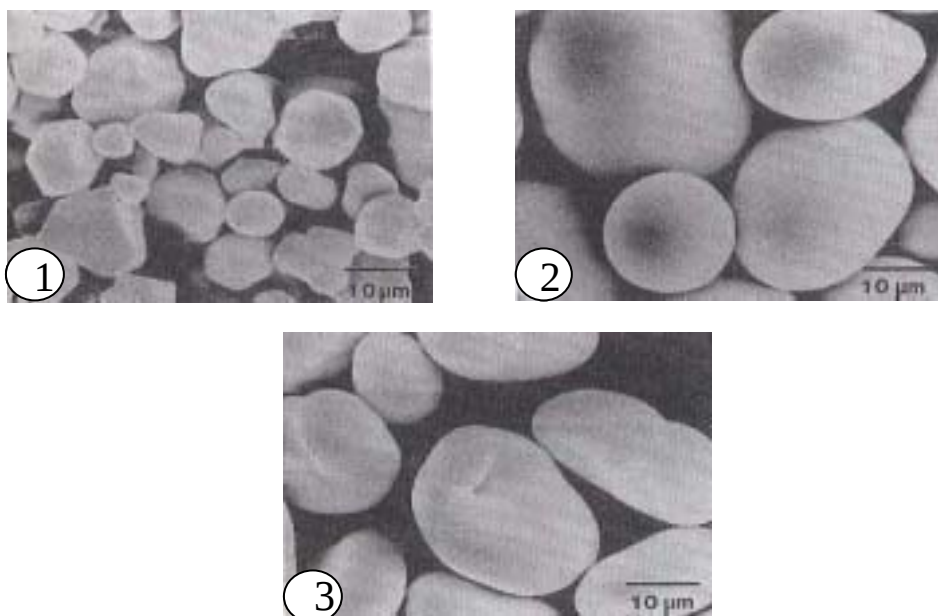
Los almidones purificados contienen niveles bajos de proteína (<0.5%) que proceden mayoritariamente de residuos de enzimas biosintéticos involucrados en la síntesis de almidón.

2.2.1. Estructura de los gránulos de almidón

Las plantas sintetizan el almidón en forma de gránulos compactados para minimizar el espacio de almacenamiento y maximizar la concentración de energía almacenada. Los gránulos de almidón tienen una superficie lisa, constituida por tramos finales de cadenas de almidón y una matriz proteica. No son solubles en agua pero se hidratan fácilmente en una solución acuosa.

El tamaño y forma del gránulo de almidón varía entre especies e incluso entre variedades. En general, los gránulos de tubérculos (ej. patata) son grandes y esféricos (figura 2.2.) mientras que los de los cereales son pequeños y poliédricos, y los de las leguminosas con forma de riñón (Gallant, 1992).

Figura 2.2. – Fotografías de los gránulos de almidón obtenidas por microscopia de Scanning. 1: Maíz, 2: Patata, 3: Guisante (Robyt, 1997).



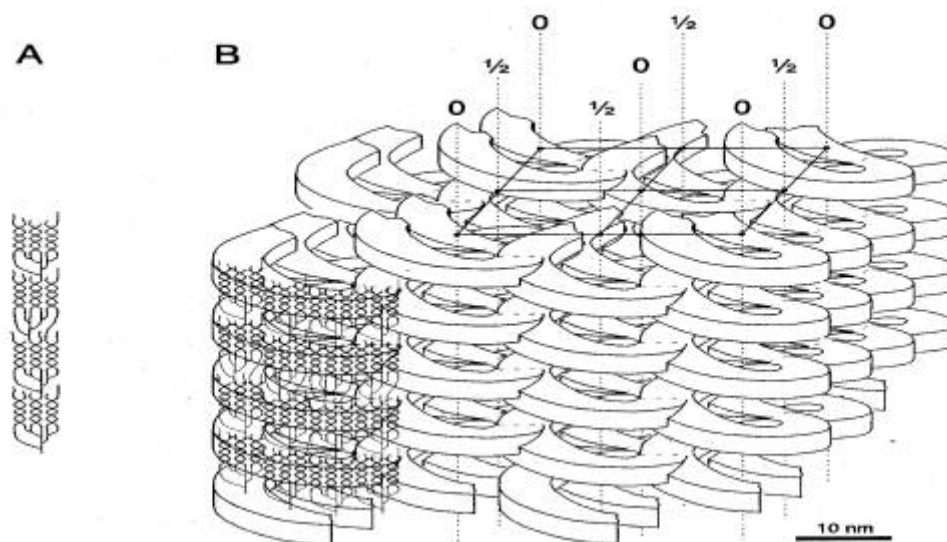
El gránulo de almidón está compuesto por un elevado número de regiones cristalinas en una matriz amorfa (French, 1984). El porcentaje de cristalinidad de los almidones crudos se encuentra entre 15-45% (Zobel, 1988). El análisis de difracción de rayos X produce 2 tipos de patrones espectrales A y B, que provienen de 2 tipos de estructuras

cristalinas. Los almidones de cereales presentan un patrón tipo A, mientras que los almidones de tubérculos presentan un patrón del tipo B, y los de las leguminosas un patrón intermedio tipo C, que es producto de una mezcla de patrones tipo A y B (Gernat, 1990). Los almidones con patrón tipo B o tipo C son más resistentes a la digestión que los almidones con patrón tipo A (Topping y Clifton, 2001). El factor que más influye en el tipo de patrón es la longitud de las cadenas de amilopectina, siendo más cortas en los almidones tipo A (23-29 unidades de glucosa) que en los tipo B (30-44 unidades de glucosa). La amilopectina está asociada a las estructuras cristalinas debido a que las ramificaciones $\alpha(1\rightarrow6)$ favorecen la formación de hélices, mientras que la amilosa ocupa la región amorfa del gránulo de almidón.

Tanto las estructuras tipo A como B presentan un modelo de disposición similar, con dobles hélices paralelas que giran hacia la izquierda. Sin embargo las estructuras tipo B contienen más agua asociada.

Oostergetel y van Bruggen (1993) construyeron un modelo de la disposición de la amilopectina en el gránulo de almidón de patata (figura 2.3.).

Figura 2.3. – Modelo de la disposición de la amilopectina en el almidón de patata.



2.2.2. Modificación de la estructura de los gránulos de almidón

Cuando los gránulos de almidón son tratados por calor, se desorganiza irreversiblemente su estructura cristalina, incrementando la susceptibilidad al ataque enzimático por α -amilasas y en consecuencia mejorando la digestibilidad y valor

nutritivo (Pérez y Oliva-Teles, 2002). La temperatura a que se alcanza esta fusión depende de la humedad. En ausencia de agua la temperatura de fusión suele ser superior a 150°C, pero se reduce a 100-120°C con un 20% de humedad (Annison y Topping, 1994). Cuando el almidón es calentado con un exceso de humedad se produce la gelatinización, que consta de dos etapas. En la primera, que tiene lugar a 60-70°C, se produce la disgregación de los gránulos de almidón (Colonna y Mercier, 1985). En la segunda, alrededor de 90°C, el almidón pierde su estructura granular permaneciendo únicamente fragmentos de amilopectina en una solución de amilosa (Jing-ming y Sen-lin, 1990). Sin embargo, la respuesta de los almidones a diferentes condiciones de temperatura y humedad varía según el tipo de gránulo. En general, los gránulos de tamaño reducido requieren temperaturas de gelatinización más elevadas que los de mayor tamaño (Chiotelli y Le Mestle, 2002). En el caso de los cereales, los gránulos ricos en amilosa pierden su estructura más lentamente que los ricos en amilopectina (Vasanthan y Bhatt, 1996), debido a que su mayor contenido en complejos amilosa-lípidos dificulta la hidratación del gránulo.

2.2.3. Gelificación, Retrogradación y formación de Almidón Resistente

Después de cualquier tratamiento térmico existe un proceso de enfriamiento que tiene lugar durante el almacenado del alimento hasta su administración. Una vez el almidón ha sido gelatinizado, si se enfría en presencia de humedad se produce el proceso de gelificación, en el cual las moléculas de amilosa y amilopectina se asocian para formar un gel (Miles et al, 1985). Las características del gel dependen de variables como la relación amilosa / amilopectina, la cantidad de agua presente y el tiempo y temperatura de almacenaje. Almidones ricos en amilosa (ej. maíz waxy) requieren mayor temperatura y presión que los ricos en amilopectina para gelificar. El proceso de gelificación empieza cuando las cadenas de glucanos recuperan su estructura helicoidal. Estas estructuras se asocian entre ellas para formar redes extensas de glucanos que darán lugar a geles inestables, ya que con el tiempo el gel del almidón recupera su cristalinidad. Esta cristalinidad puede ser detectada por rayos X mostrando un patrón de difracción tipo B (Colonna et al, 1982). La formación de este patrón tipo B se conoce como retrogradación y puede tardar en aparecer desde varias horas, en el caso de almidones ricos en amilosa, a varios días o incluso semanas, en el caso de almidones ricos en amilopectina (Lii et al, 2004). Así pues, el proceso de recristalización es más rápido en almidones con mayor cantidad de amilosa (Zhang y Jackson, 1992), aunque estos almidones son más resistentes a la retrogradación porque requieren de condiciones de gelatinización más extremas (Colonna y Mercier, 1985). El tratamiento con α -amilasa del almidón sometido al proceso de

retrogradación, libera el almidón no retrogradado, dejando la fracción que resiste la amilolisis y que fue denominada por Berry (1986) como almidón resistente.

El proceso de retrogradación puede estar inhibido por la presencia de azúcares libres (ej. almidón de patata; Kohyama y Nishinari, 1991), arabinoxilanos solubles (constituyentes del endospermo de la pared celular de algunos cereales; Gudmundsson et al, 1991) y complejos amilosa-lípidos (Szczodrak y Pomeranz, 1992).

2.3. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO

El almidón debe ser completamente despolimerizado a glucosa para que pueda ser absorbido en intestino delgado. La despolimerización es llevada a cabo por diferentes enzimas que rompen los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$. En las especies monogástricas los enzimas principales son α -amilasas (tabla 2.3.; Tester et al, 2004). La hidrólisis del almidón se inicia en la cavidad oral, con la acción de la α -amilasa de la saliva. La masticación a su vez contribuye a aumentar la superficie de contacto, facilitando el acceso del enzima. Este enzima rompe enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, liberando maltosa, maltotriosa y dextrinas a partir de las moléculas de almidón. La digestión salivar continua en el esófago y en la parte esofágica del estómago. Tiene poca afinidad por los enlaces terminales, y tampoco puede actuar ni sobre los enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ ni sobre los situados cerca de ellos. La relación entre la secreción de α -amilasa salivar y pancreática es de 1:250.000 (Low y Longland, 1990). No obstante, su actuación es significativa, ya que se considera que este enzima contribuye en un 15% al total de la digestión del almidón (Björck, 1996).

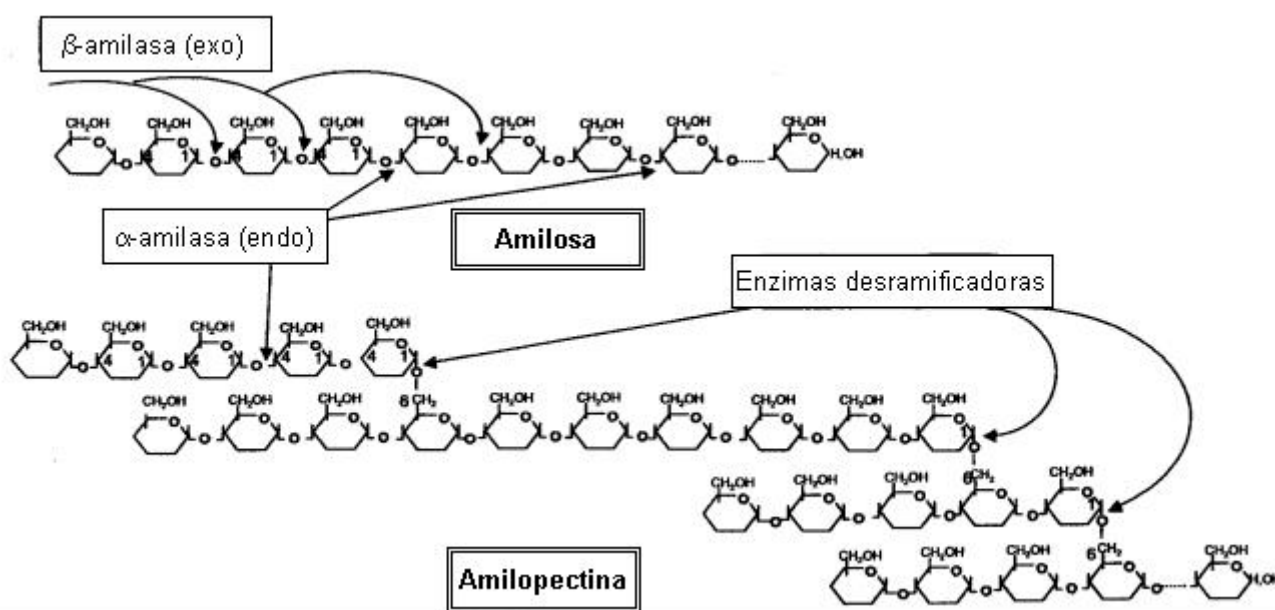
Tabla 2.3. – Enzimas que participan el la hidrólisis del almidón¹.

Enzima	Numero (EC)	Especificidad de enlace	Modo de acción	Producto final
Fosforilasa (1,4- α -D-glucan: ortofosfato α -D-glucosil transferasa)	2.4.1.1	α (1-4) glucosil	exo	Glucosa 1-fosfato
α -amilasa (1,4- α -D-glucan maltohidrolasa)	3.2.1.1	α (1-4) glucosil	endo	Oligosacáridos lineales y ramificados
β -amilasa (1,4- α -D-glucan maltohidrolasa)	3.2.1.2	α (1-4) glucosil	exo	Maltosa y dextrinas límite
Amiloglucosidasa (glucoamilasa; exo-1,4- α -glucosidasa)	3.2.1.3	α (1-4) glucosil and α (1-6) glucosil	exo / endo	Glucosa
Isoamilasa (glucogeno 6-glucanohidrolasa)	3.2.1.68	α (1-6) glucosil	endo	Cadenas lineales de $\alpha(1-4)$ glucano
Pululanasa (dextrinasa límite; amilopectin 6-glucanohidrolasa)	3.2.1.41	α (1-6) glucosil	endo	Cadenas lineales de $\alpha(1-4)$ glucano

¹ Según Tester et al (2004)

En estomago, el reducido pH inactiva la α -amilasa, y no es hasta duodeno en donde el pH del contenido digestivo se neutraliza, que los enzimas pancreáticos y de la mucosa pueden actuar. La α -amilasa pancreática es muy similar a la salivar, aunque no rompe enlaces al azar, sino que presenta una tendencia a actuar sobre los extremos, produciendo residuos de maltosa. Los productos resultantes de la degradación del almidón (maltosa, maltotriosa y dextrinas límite), difunden a la superficie luminal de la mucosa intestinal donde se encuentran una serie de carbohidrasas. Entre ellas se encuentran las maltasas (convierten la maltosa generada por las α -amilasa en glucosa) e isomaltasas (también denominadas α -dextrinasas) las cuales hidrolizan los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ de isomaltosas y α -dextrinas (Tabla 2.3.). En la Figura 2.4., se representa esquemáticamente la hidrólisis del almidón por los enzimas hidrolíticos.

Figura 2.4. – Patrón de actuación de los enzimas hidrolíticos sobre la amilosa y amilopectina (adaptado de Tester et al, 2004)¹.



¹ La β -amilasa es una exoenzima que se une a moléculas de β -maltosa desde el extremo no reducido de amilosa o desde las cadenas externas de las ramificaciones de amilopectina. La α -amilasa es una endoenzima que hidroliza al azar enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ dando lugar a maltooligosacáridos. Los enzimas desramificadores (ej. isoamilasa o pululanasa) hidrolizan específicamente enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ de amilopectina.

La glucosa resultante de estos procesos de hidrólisis enzimática es absorbida directamente a través de transportadores activos de la mucosa intestinal (GLUTs) (Zierler et al, 1999). Sin embargo, a pesar de la elevada actividad amilasa en intestino

delgado (Low y Longland, 1990; Glitsø et al, 1998), la hidrólisis del almidón y la absorción de la glucosa resultante no siempre es completa, como demuestran estudios en humanos intubados en que se encuentra glucosa libre en ileon terminal (Stephen et al, 1983). La fracción de almidón y productos de su degradación que escapan a la digestión enzimática se ha denominado "almidón resistente" (Asp, 1992), lo cual ha llevado a confusión con el almidón obtenido de la retrogradación. Obviamente, el almidón retrogradado es resistente al ataque de las amilasas en intestino delgado, pero el almidón resistente definido por Asp (1992) puede ser resultado de otros factores. De esta forma debe distinguirse el almidón químicamente resistente (almidón resistente a la hidrólisis *in vitro*) del almidón fisiológicamente resistente (almidón que pasa a través del intestino delgado sin degradarse y alcanza el intestino grueso).

Englyst et al (1992) clasificó a los almidones resistentes según sus factores intrínsecos de composición o procesado en 3 tipos, pero posteriormente se añadió un cuarto grupo (Brown et al, 1995; tabla 2.4.)

Tabla 2.4. – Clasificación de almidones resistentes¹.

Tipo de Almidón Resistente	Ejemplo
AR1: Físicamente inaccesible	Granos y semillas parcialmente triturados
AR2: Gránulos resistentes	Patata cruda, banana verde, algunas legumbres y almidones ricos en amilosa
AR3: Retrogradado	Pan, cornflakes, patatas cocidas y enfriadas
AR4: Modificado químicamente	Almidones eterizados, esterificados o con enlaces cruzados (utilizados en alimentos procesados)

¹Según Englyst et al (1992) y Brown et al (1995)

2.3.1. Factores intrínsecos condicionantes de la digestión del almidón

2.3.1.1. Barreras físicas:

2.3.1.1.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula afecta la digestión del almidón debido a que las partículas más pequeñas (con mayor superficie respecto al volumen) facilitan la acción de las amilasas y se digieren más rápidamente que las partículas de mayor volumen. De esta forma un mayor grado de molido (o una mayor masticación) pueden facilitar la digestión de los almidones. Liljeberg et al (1992) estudiaron *in vivo* la digestibilidad del almidón de cereales molidos o enteros a partir de la evaluación de la glicemia postprandial (índice glicémico). Los resultados obtenidos demostraron que los granos

enteros disminuyen el ritmo de digestión del almidón y por lo tanto reducen la digestibilidad de la dieta. En consecuencia, también reducen o retrasan la glicemia e insulinemia postprandial.

El descenso en la digestión enzimática del almidón debido a la molienda grosera del pienso se ha observado tanto en ensayos *in vitro* (Snow and O'Dea, 1981; Anguita et al, 2006a) como *in vivo* (Owsley et al, 1981; Bach Knudsen and Jorgensen, 2001; Anguita et al, 2006b). Guillou y Landeau (2000) describieron en raciones a base de maíz para cerdos en crecimiento, que una disminución en el tamaño de partícula de 100 μm mejora la digestibilidad de la energía y el N en un 0,69 y 0,5%, respectivamente. Las diferencias se deben fundamentalmente a que un mayor tamaño de partícula aumenta la excreción en las heces de fracciones orgánicas como la proteína y los polisacáridos no amiláceos; si bien también es frecuente encontrar restos de almidón en las heces (Anguita et al, 2006b).

2.3.1.1.2. Matriz proteica

Los gránulos de almidón están acompañados por otras materias vegetales (ej. componentes de pared celular) que pueden inhibir el acceso de las amilasas al gránulo. En algunos casos, los gránulos de almidón pueden estar encapsulados en una matriz proteica. En estos casos, la proteína debe ser degradada por proteasas para que la actividad de la amilasa pueda ser efectiva. En el caso de la judía roja (*Phaseolus vulgaris*), el estudio de la digestibilidad del almidón *in vitro* reveló que la amilolisis estaba favorecida por el pretratamiento con pepsina (Tovar et al, 1990). En el caso del sorgo, el gránulo de almidón, presenta una estructura y un tamaño similar al del maíz, con una proporción similar de amilosa, pero se le atribuye un 90-95% del valor nutricional del almidón de maíz (Hahn et al, 1984; NRC, 1998). De hecho, en estudios de digestibilidad comparada en cerdos en crecimiento entre ambos cereales, el maíz fue siempre más digerido, tanto en intestino delgado como en grueso (Pascual-Reas, 1997; Morales et al, 2002a). Esta diferencia se ha asociado a un endospermo periférico proteico denso propio del gránulo del sorgo, que le hace más resistente a la penetración del agua y los enzimas (Rooney y Pflugfelder, 1986). Además, algunas variedades de sorgo presentan también taninos como factores antinutricionales (Rooney y Pflugfelder, 1986; Lizardo et al, 1995) que podrían limitar en parte la actividad enzimática sobre el sustrato.

2.3.1.1.3. *Complejos amilosa-lípidos*

La presencia de complejos de amilosa con lípidos en los cereales, restringe la capacidad de hidrólisis por α -amilasas (Lauro et al, 1999), ya que evita la hidratación del gránulo, dificulta la penetración de la enzima y restringe su actividad hidrolítica. Estudios *in vitro* demuestran que la liberación de glucosa por la α -amilasa porcina, es más reducida en los complejos amilosa-lípidos, que en la amilosa libre (Holm et al, 1983). En estos estudios, la digestión de la amilosa de los complejos puede ser completa si se incrementan los niveles de α -amilasa. Sin embargo, estudios *in vivo* demuestran que en los complejos amilosa-lípidos, la hidrólisis del almidón es más lenta que en la amilosa libre, y en ningún caso es completa (Holm et al, 1983).

El almidón que no se digiere en intestino delgado debido a que es físicamente inaccesible por los enzimas digestivos se clasifica como almidón resistente tipo 1.

2.3.1.2. Estructura del gránulo de almidón

2.3.1.2.1. *Estructura cristalina*

Clásicamente se ha considerado que la estructura cristalina (tipo A, B o C) de los gránulos de almidón es el factor que determina en mayor medida la susceptibilidad a los enzimas hidrolíticos (Williamson et al, 1992). Los gránulos con un patrón de difracción tipo B y C (ej. en la patata, banana verde y legumbres) y tamaños moleculares más grandes, son más resistentes a las α -amilasas que los que tienen un patrón tipo A (cereales). Sin embargo, existen otros factores que condicionan la hidrólisis del almidón, como son el tamaño del gránulo, su composición y la pérdida de estructura del gránulo (que es equivalente al grado de gelatinización).

2.3.1.2.2. Tamaño del gránulo

Los gránulos de mayor tamaño tienen menos superficie en relación al volumen, por lo tanto, la capacidad de enlace por parte de las amilasas y en consecuencia su actividad hidrolítica es menor que en los gránulos más pequeños. En el caso concreto de la patata, la digestibilidad del almidón es reducida debido a que los gránulos tienen una estructura predominante tipo B y además la relación superficie / volumen es reducida debido al gran tamaño de los gránulos. En cambio, las espirulitas, que al igual que la patata presentan una estructura tipo B, son rápidamente hidrolizadas por amilasas debido a que la relación superficie / volumen es mayor, incrementando el área expuesta al ataque enzimático.

2.3.1.2.3. Composición del gránulo

Los almidones tipo waxy presentan mayor cristalinidad que los normales, y en consecuencia son más susceptibles de ser fraccionados por molturación. Por este motivo, son más susceptibles al ataque por α -amilasas que otros almidones con menor grado de cristalinidad (Bettge et al, 2000).

En cuanto a gránulos enteros, existe cierta controversia en la bibliografía acerca del efecto de la proporción de amilosa y amilopectina sobre la digestibilidad. La amilosa, debido a su estructura lineal, debería ser digerida *a priori* en mayor medida que la amilopectina, tal y como han contrastado diferentes autores (Keys y DeBarthe, 1974; Low y Longland, 1990). Keys y DeBarthe (1974) determinaron la digestibilidad ileal en cerdos en crecimiento del almidón y de cada una de sus fracciones, amilosa y amilopectina, de cuatro fuentes de cereales diferentes (trigo, sorgo, maíz y cebada). En todas ellas, la amilosa siempre fue digerida en mayor grado que la amilopectina (92.5 vs. 87.8% digestibilidad media, respectivamente). Resultados similares se han encontrado en ratas (Zhou et al, 1997). En el sentido opuesto, son varios los estudios que señalan que una mayor relación amilosa:amilopectina determina una peor digestibilidad del almidón, tanto en ratas (Granfeldt et al, 1993; Kabir et al, 1998) como en cerdos (Pettersson y Lindberg, 1997; Grosjean et al, 1998). Estos autores concluyeron que la relación amilosa-amilopectina por si sola no es un buen indicador de la digestibilidad de un almidón, sino que también deben tenerse en cuenta otras características físico-químicas del gránulo.

Los gránulos de almidón resistentes por su estructura son clasificados como almidón resistente tipo 2.

2.3.2. Factores extrínsecos condicionantes de la digestión del almidón

2.3.2.1. Procesado

La incorporación de procesos tecnológicos en la alimentación del ganado, como la molienda ya descrita o los tratamientos térmicos, tiene como finalidad fundamental favorecer los procesos de mezcla, homogenización e higiene del pienso; pero también incrementar su valor nutricional. El procesado del pienso reduce el tamaño de las partículas, con los efectos sobre la digestibilidad del almidón descritos previamente, y puede determinar una cierta gelatinización del almidón.

2.3.2.1.1. *Gelatinización*

Los almidones gelatinizados son mucho menos resistentes a la hidrólisis enzimática que los crudos. El papel de la desorganización de los gránulos de almidón quedó demostrada en un experimento (Ring et al, 1988) en el cual el almidón de cebada fue sometido a diferentes temperaturas (50, 55 y 60°C durante 3h). La gelatinización de los gránulos de almidón se produjo a 60°C asociado a un incremento de la digestibilidad por α -amilasa.

En los procesos tecnológicos propios de la fabricación de piensos, el almidón es sometido a diferentes condiciones de temperatura y humedad. Durante estos procesos el almidón puede ser parcialmente gelatinizado, mejorando su valor nutritivo. En el caso de la peletización, solamente entre el 1 y 20% del almidón es gelatinizado (Moritz et al, 2003; Svihus et al, 2004), de tal forma que el impacto sobre la digestibilidad es muy reducido (Svihus et al, 2005). Kotara y Fuchs (2001), demostraron que los cerdos mejoraban la digestibilidad del almidón cuando el pienso era peletizado dos veces a elevadas temperaturas, debido a que el almidón alcanzaba un mayor grado de gelatinización. El proceso de expansión produce la gelatinización de entre el 22 y 35% del almidón (Cramer et al, 2003). Sin embargo, el grado de gelatinización sigue siendo demasiado reducido para observar efectos significativos en la digestibilidad del almidón. En cambio, durante el proceso de extrusión se produce una disgregación y gelatinización más completa de los gránulos (Colonna et al, 1989) incrementando significativamente la digestibilidad del almidón (Ljøkjel et al, 2004; Anguita et al 2006a).

2.3.2.1.2. *Retrogradación*

El proceso de retrogradación conduce a la formación de almidón resistente tipo 3 (AR3), indigestible a nivel ileal. Schweizer et al (1990) analizó almidones (copos de patata y judía) por su contenido AR3 según la determinación de Englyst et al (1992). Cuando estos alimentos fueron consumidos por humanos ileostomizados todo el almidón resistente fue recuperado en el efluente ileal. En 1992 Tovar et al. examinaron la digestibilidad de leguminosas (judías y lentejas) y encontraron que al menos el 90% del almidón retrogradado era recuperado en heces. Este almidón, resistente a la digestión en intestino delgado, presenta también una elevada resistencia a la degradación microbiana en intestino grueso. Almidones con este nivel de resistencia tienen limitado valor nutritivo comparado con otros almidones fermentables y por lo tanto desde un punto de vista nutritivo podrían ser considerados análogos de la celulosa.

En el proceso de fabricación de piensos, la retrogradación del almidón puede tener lugar bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo inmediatamente después de la extrusión, antes de que el pienso se haya enfriado y secado. Jouppila et al (1998) demostró que el almidón gelatinizado no alcanza la retrogradación hasta después de 5.2 días si está almacenado a 60°C, pero este tiempo se reduce a 34 minutos si la temperatura es de 80°C.

2.3.2.1.3. *Modificaciones químicas*

Brown et al (1995), definió un cuarto tipo de almidón resistente (AR4), que representa el grupo de almidones que han sido modificados enzimáticamente (enlaces cruzados con reactivos químicos, éteres, ester, etc...) de tal modo que se interfiere la acción de los enzimas digestivos y en consecuencia disminuye la digestibilidad. Existen cuatro subcategorías de AR4, basadas en dos de sus propiedades. En primer lugar, según la capacidad del AR4 de ser analizado utilizando técnicas *in vitro* de fibra dietética (Prosky et al, 1994) y almidón resistente (McClearly y Monaghan, 2002), o solamente de almidón resistente, y en segundo lugar según su solubilidad en agua. Estudios *in vitro* han demostrado que los almidones modificados resisten la amilólisis de forma proporcional a su grado de modificación (Wurzburg, 1986). En humanos se estudió la glicemia postprandial tras la administración de 2 tipos de almidones modificados (por α -ciclodextrinización y por acetilación). Ambos almidones modificados produjeron menores índices glicémicos que los almidones de referencia, sugiriendo que la hidrólisis en intestino delgado fue incompleta. En otro estudio con almidones acilados (Annison y Topping, 1994) se comprobó que el almidón alcanzaba intestino grueso, donde era capaz de liberar su ácido esterificado y fermentarse produciendo AGV. Sin embargo, el tipo de modificación es importante para determinar su funcionalidad, ya que Ebihara et al (1998) demostraron que el almidón hidroxipropilado alcanzaba ciego pero no producía AGV.

2.3.2.2. Factores dependientes del animal o del resto de la dieta.

La digestión del almidón también está condicionada por la madurez del sistema digestivo del animal. El grado de digestión del almidón se incrementa con la edad asociado al mayor tamaño del tracto digestivo y a la mayor actividad de los enzimas amilolíticos. En el caso concreto del lechón la actividad amilasa pancreática es baja en el momento del nacimiento. A partir de este momento y hasta las tres semanas de vida, la actividad enzimática aumenta ligeramente (x 2.8), y no es hasta la sexta semana en que se incrementa drásticamente (x 27.5; Corring et al, 1978; Owsley et al, 1986).

Estos incrementos en la actividad amilasa coinciden con el momento del destete y significan una respuesta a la necesidad de digerir la elevada cantidad de almidón presente en el primer pienso sólido que recibe el animal (entre 600 y 800 g/kg; Wiseman et al, 2001). Al igual que la actividad amilasa, también se asocian al cambio de dieta propio del destete, la actividad maltasa, que incrementa hasta la octava semana de vida (Aumaitre y Corring, 1978) y las actividades isomaltasa y maltasa 2 y 3, que no alcanzan su máxima actividad hasta que el cerdo alcanza 200 días de vida (Kidder y Manners, 1980).

A parte de la capacidad enzimática del tracto digestivo, la digestión del almidón también depende de la composición del resto de la dieta. En este sentido, se ha demostrado que la inclusión de polisacáridos no amiláceos (PNA) solubles a la dieta tiene una influencia negativa en la digestión y absorción de almidón, ya que los PNA aumentan la viscosidad del contenido intestinal y en consecuencia perjudican la difusión de los enzimas digestivos (Classen y Bedford, 1991). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la liberación de glucosa se reduce cuando incrementa la viscosidad del medio debido a la adición de arabinoxilanos procedentes de arroz (Fengler y Marquardt, 1988). Numerosos estudios han demostrado que es posible reducir la viscosidad de la digesta, y por lo tanto mejorar la digestión del almidón a partir de la adición de enzimas exógenos a la dieta (Graham et al, 1989; Baidoo et al, 1998; Omogbenigun et al, 2004).

2.3.3. Determinación del almidón resistente

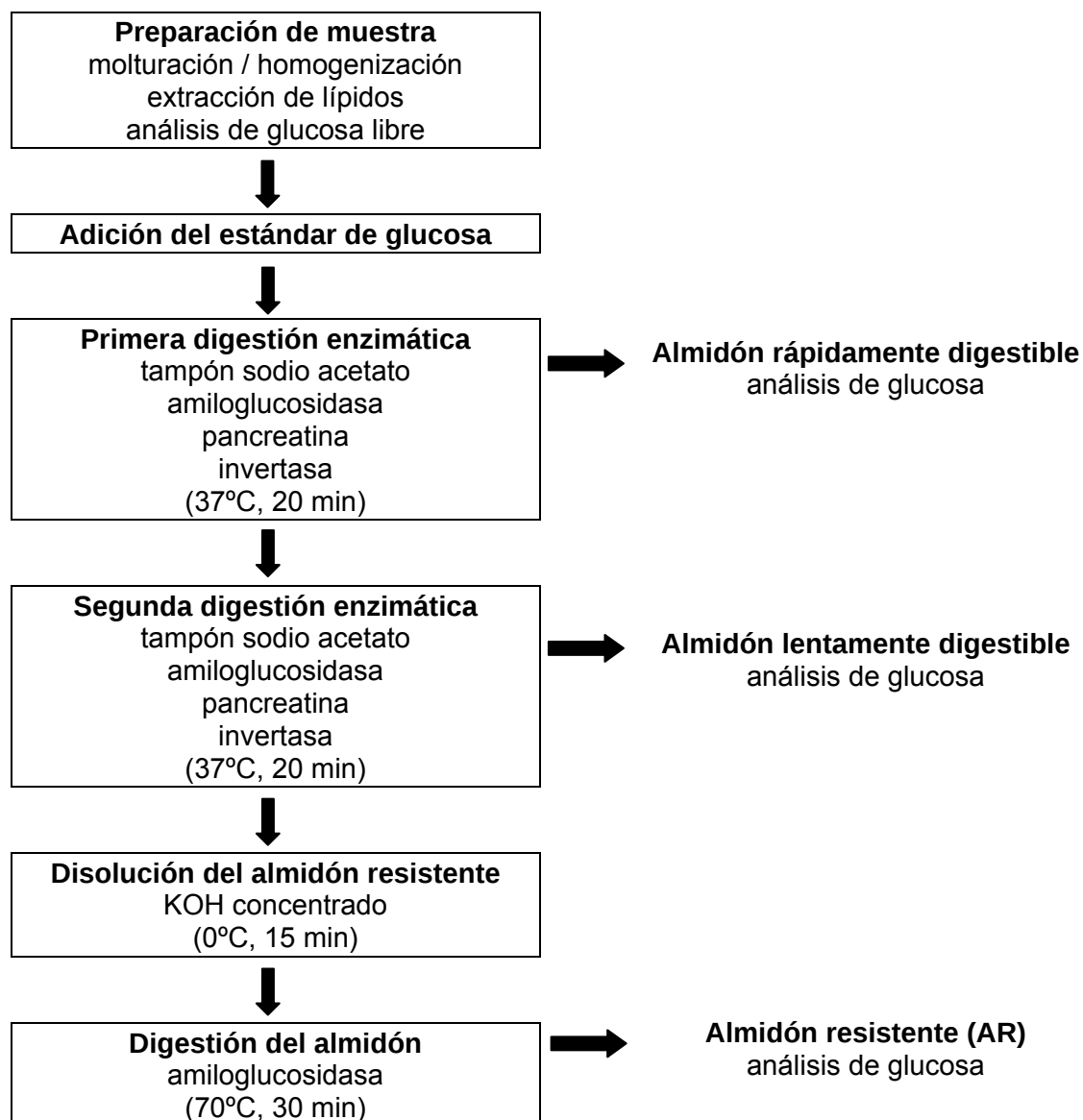
2.3.3.1. Técnicas *in vitro*

El almidón se determina como glucosa liberada tras la hidrólisis enzimática realizada en dos pasos: en el primero se gelatiniza la muestra y se utiliza α -amilasa termoestable, y en el segundo se realiza una hidrólisis con amiloglucosidasa (Holm et al, 1986). Durante la última década se ha generado un fuerte interés por cuantificar analíticamente la proporción de los diferentes ingredientes resistente a la degradación enzimática en intestino delgado. Se han desarrollado dos métodos (Champ, 1992; Englyst et al, 1992), basados en una simulación de lo que sucede *in vivo* en el tracto digestivo, sometiendo la muestra a una hidrólisis enzimática controlada y determinando posteriormente la glucosa liberada.

En ambas técnicas, el primer paso consiste en la extracción del almidón digestible del alimento utilizando α -amilasa pancreática (en los casos en que puede existir inhibición

de la enzima pancreática por los productos de la digestión se añade amiloglucosidasa). En algunos casos la amilolisis es precedida por una proteolisis con pepsina y tripsina para mimetizar la acción del estómago e intestino. El almidón resistente se cuantifica directamente en el residuo (Champ, 1992) o por diferencia entre el almidón total y el almidón digestible que se determina separadamente (Englyst et al, 1992; figura 2.5.). El método propuesto por Englyst et al (1992) obtiene diferentes porciones del almidón total: rápidamente digestible, lentamente digestible y almidón resistente. A su vez, obtiene tres fracciones de almidón resistente (AR1, almidón físicamente inaccesible; AR2, gránulos resistentes; y AR3, almidón retrógrado). Los factores extrínsecos dificultan una reproducción real de lo que sucede *in vivo*, y en general la determinación *in vitro* subestima la cantidad de almidón no digerido en el tracto digestivo anterior del animal, aunque son importantes las diferencias individuales. Aun así, hay estudios en humana que han encontrado una buena relación entre la cantidad de almidón resistente cuantificada por estos métodos analíticos y la que realmente se obtuvo *in vivo* (Englyst et al, 1996). En cualquier caso, por el momento las tablas de composición de los diferentes ingredientes utilizados en la alimentación animal, no suelen aportar información sobre la proporción del almidón que es resistente.

Figura 2.5. - Esquema del método de Englyst para la determinación de almidón resistente.



2.3.3.2. Técnicas *in vivo*

La cantidad de almidón resistente puede ser determinada *in vivo* en estudios con humanos o animales.

En experimentación animal se utilizan métodos invasivos como la canulación ileal o las anastomosis ileorectales, que se llevan a cabo principalmente en cerdos, o el sacrificio de los animales para determinar el almidón que permanece en ileon terminal que se lleva a cabo tanto en cerdos como en ratas. Tanto las cánulas como el sacrificio requieren la utilización de un marcador. En animales canulados, el marcador se utiliza para verificar la excreción de residuos del alimento experimental, mientras que en muestras obtenidas de animales sacrificados el marcador permite realizar un cálculo aproximado de la digestibilidad.

En humanos, teóricamente existen 3 métodos disponibles: el test de excreción de hidrógeno (en el aire expirado), la intubación de individuos sanos y estudios en individuos ileostomizados. Este último método ha sido el más comúnmente utilizado debido a que es menos invasivo que la intubación de individuos sanos y más específico que la excreción de hidrógeno (Champ, 2004). Teóricamente la excreción de hidrógeno está relacionada con la cantidad de carbohidratos no digeridos. Si el alimento experimental no contiene ningún carbohidrato indigestible, excepto el almidón a evaluar, se puede asumir que la excreción de hidrógeno está relacionada con la cantidad de almidón resistente que ha fermentado. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad de hidrógeno excretado difiere entre carbohidratos que se fermentan más rápida o más lentamente, de tal modo que este método ha sido considerado poco apropiado para la cuantificación de almidón resistente *in vivo* (Champ, 2004).

Las comparaciones entre las técnicas de intubación e ileostomía son muy escasas debido al escaso número de estudios realizados por intubación (Langkilde et al, 2002; Faisant et al, 1995). Con la misma cantidad de almidón de banana verde (30g equivalente a 23.1g de almidón resistente) los individuos intubados digirieron menos almidón (16.3%) que los ileostomizados (31.6%) del total ingerido. La digestibilidad real del almidón probablemente se encuentra entre ambos valores, ya que se puede esperar que la intubación subestime la digestión real por la presencia del tubo, mientras que la ileostomía puede sobreestimarla debido a un posible crecimiento bacteriano en ileon terminal por adaptación.

2.3.4. Consecuencias fisiológicas del almidón resistente en intestino delgado

2.3.4.1. Trastornos clínicos

La digestión incompleta de los azúcares en el intestino delgado puede provocar síndromes de malabsorción. En el caso de azúcares simples, esta malabsorción puede generar problemas clínicos, como puede ser el caso de la intolerancia a la lactosa en animales jóvenes. Generalmente los síntomas clínicos son el resultado de la acumulación de azúcares en intestino grueso en cantidades que exceden la capacidad de fermentación de la microbiota, de tal forma que se produce un desequilibrio en el ecosistema intestinal y en consecuencia la aparición de diarrea osmótica (Holtug et al, 1992).

También se ha demostrado que altos niveles de fibra en la dieta, por ejemplo en forma de goma arábica (Topping et al, 1988), producen la aparición de diarreas debido a la acumulación de fluidos en intestino grueso. En el caso del almidón resistente los resultados son contradictorios. Algunos autores (Pluske et al, 1998) han relacionado la presencia de almidón resistente en la dieta con una mayor incidencia de disentería tras infección experimental. Otros autores (Fleming et al, 1985) han demostrado que la administración de almidón resistente, por ejemplo en forma de judías rojas, incrementa la producción de gas como resultado de la fermentación en intestino grueso, pero no se asocia a la aparición de diarreas. Por lo contrario, la administración de almidón resistente en niños con diarreas puede acelerar el proceso de su recuperación (Topping y Clifton, 2001). Este diferente comportamiento respecto a otros carbohidratos, se debe a la elevada fermentabilidad y reducida capacidad de retención de agua del almidón resistente, de tal forma que su impacto sobre la humedad de las heces es poco significativo.

2.3.4.2. Índice glicémico

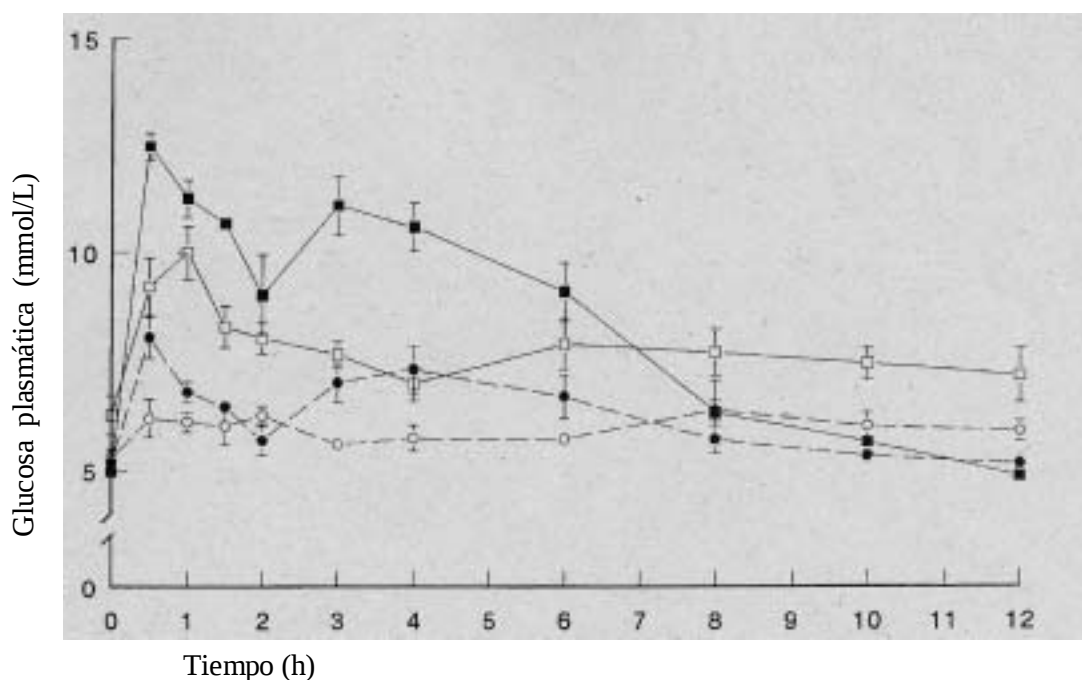
En su conjunto, diferentes factores intrínsecos al alimento o también al animal, pueden condicionar la fracción de almidón que se digiere en intestino delgado y la velocidad de su disponibilidad. Las diferencias en la digestión del almidón se reflejan en variaciones en las concentraciones de glucosa plasmática en el tiempo.

En general, la digestión del almidón produce una respuesta en la glicemia postprandial menor que la cantidad equivalente de monómeros de glucosa liberados. Así, la glucosa plasmática y la concentración de insulina depende en gran medida del tipo de almidón, lo que permite una clasificación de los almidones según su influencia en la

glicemia postprandial. En 1981 se propuso el concepto de índice glicémico (IG) que se define como el área debajo de la curva del incremento de glucosa plasmática postprandial de un producto testado respecto al área de un producto de referencia. Originalmente se utilizó de referencia, la ingestión de 50g de glucosa, pero después se utilizó pan blanco (Jenkins, 1981).

Resulta evidente que un descenso en la digestión del almidón limita la cantidad de glucosa que puede ser absorbida en intestino delgado. En general la presencia de fracciones de almidón resistente provoca índices glicémicos más reducidos que los almidones más digestibles. Royall et al (1990) observó que existe una correlación negativa entre el porcentaje de almidón resistente y el índice glicémico de una dieta. Del mismo modo, van der Meulen (1997b), observó que la concentración de glucosa arterial y portal obtenida en cerdos alimentados con almidón de patata era significativamente inferior a la obtenida con almidón de maíz, debido a la menor cantidad de almidón digerido y probablemente al ritmo inferior de su digestión. También se han detectado diferencias en los índices glicémicos obtenidos en animales alimentados con fuentes de almidón completamente digestibles en intestino delgado (van der Meulen, 1997a). La incorporación en la ración de almidón de digestión lenta como la del guisante, produce concentraciones de glucosa plasmática menos elevadas pero más duraderas que otro almidón más rápidamente digestible como el del maíz (Figura 2.6.).

Figura 2.6. – Concentración arterial (□, ■) y portal (○, ●) de la glucosa plasmática en cerdos después de la ingestión de una ración que contenía almidón de maíz (■, ●) o de guisante (□, ○) (van der Meulen, 1997a).



Sin embargo, otros autores han obtenido resultados contradictorios. Por ejemplo, Truswell (1992) encontró índices glicémicos muy elevados en productos como los copos de maíz que poseen una mayor cantidad de almidón resistente (retrogradado). Las leguminosas en cambio, presentaron IG relativamente bajos, en concordancia con su mayor proporción de almidón enzimáticamente resistente. Las causas de esta variabilidad son atribuidas por los autores a deficiencias analíticas en la determinación del almidón resistente propuesta por Englyst et al (1992), sugiriendo que determinada fracción del almidón resistente estimada *in vitro* puede ser digerido completamente en intestino delgado *in vivo* si el transito es suficientemente lento.

Las diferencias promovidas por los diferentes tipos de almidón sobre la glicémia, afectan directamente a la insulinemia posprandial. Diversos estudios han observado una disminución en el nivel de insulina plasmática tras la administración de AR respecto a un almidón plenamente digestible (Liljeberg and Bjorck, 1994; Skrabanja et al, 2001; Behall y Hallfrisch, 2002), mientras que otros no han observado ningún efecto (Noakes et al, 1996; Jenkins et al, 1998; Nestel et al, 2004). De estos estudios se puede extraer que para observar algún efecto sobre la glicémia e insulinemia, el AR debe suponer más del 14% del almidón total de la dieta.

La disminución en la glicemia e insulinemia puede afectar la saciedad. Raben et al (1994) describieron menores índices de saciedad subjetiva tras la administración de 50g de almidón crudo de patata (RS2; 54% AR) que tras la administración de 50g de almidón de patata pregelatinizado (0% AR). En el mismo sentido Anderson et al (2002) describió una correlación negativa entre el nivel de almidón resistente en la dieta y el índice de saciedad una hora postingestión de alimento. En estos estudios, los menores índices de saciedad estuvieron asociados a una menor concentración plasmática de glucosa e insulina. Sin embargo, algunos autores no han observado ninguna relación (Westrate y van Amelsvoort 1993; Mèance et al, 1999), mientras que otros han observado un incremento en la saciedad tras la administración de un pan rico en almidón resistente respecto un pan normal, entre 70 y 120 minutos postingestión. Las diferencias entre estudios probablemente sean debidas a dificultades para estandarizar el contenido en macronutrientes de la dieta, o asociadas a señales de saciedad procedentes del tracto digestivo.

2.3.4.3. Almidón resistente y metabolismo lipídico

La disminución en el índice glicémico promovida por la administración de almidón resistente tiene también consecuencias sobre el metabolismo lipídico. Tras la administración de almidón resistente, se han observado reducciones en la trigliceridemia, colesterolemia, nivel plasmático de lipoproteínas de alta densidad (HDL), de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL), y lipoproteínas ricas en triglicéridos (de Deckere et al, 1993, 1995; Younes et al, 1995a; Kishida et al, 2001; Lopez et al, 2001). En estos estudios se observaron reducciones del 22-32% en el nivel de colesterol plasmático y del 29-42% del nivel de triglicéridos.

Otra de las posibles consecuencias de la administración de almidón resistente, es la reducción en la síntesis y depósito de grasa. Estudios *in vivo*, indican que la administración de dosis elevadas de almidón resistente puede disminuir el tamaño de los adipocitos (Kabir et al, 1998; Kishida et al, 2001), y el peso del tejido adiposo (de Deckere et al, 1993; Lerer-Metzger et al, 1996). En el tejido adiposo, la orientación del metabolismo depende de la disponibilidad de carbonos (principalmente en forma de glucosa) y del estado hormonal (resultante del equilibrio entre insulina y glucagon).

La actividad de los enzimas lipogénicos del tejido adiposo, se regula a partir del control de su transcripción génica por parte de la glicemia (Shillabeer et al, 1992; Towle et al, 1997), y la insulinemia (Girard et al, 1997; Kabir et al, 1998). Morand et al (1994) demostró que la sustitución de almidón digestible por AR inhibía significativamente la actividad de los principales enzimas lipogénicos (desde un 25% en el caso de la acetil-

CoA carboxilasa, hasta un 40% en el caso de la sintasa de ácidos grasos) debido a una reducción en la glucosa e insulina plasmática. Además, el nivel de insulina plasmática también regula la expresión de uno de los principales enzimas responsables de la absorción de glucosa en adipocitos y células musculares (GLUT 4; Zierler et al, 2001). Kabir et al (1998) demostró que la administración de almidones con diferente índice glicémico, promovía diferencias en el nivel de expresión de RNAm de GLUT4 en tejido adiposo. Estos autores asociaron el incremento en la capacidad de captación de glucosa plasmática con una mayor actividad de los enzimas lipogénicos y un mayor depósito de grasa. En su conjunto, estos resultados sugieren que la depresión de la síntesis grasa observada tras la administración de almidón resistente es resultado de la inhibición coordinada de diversos enzimas de la ruta biosintética y de la captación tisular de glucosa en el tejido adiposo.

Aunque existe menos bibliografía al respecto, también se ha descrito el efecto de los carbohidratos de la dieta sobre el depósito de grasa intramuscular. Chicco et al (2003) demostró en ratas que administrar una dieta rica en sacarosa durante 15 o 30 semanas promovía un incremento en la glicemia plasmática que repercutía en un mayor depósito de grasa muscular. Del mismo modo, en humanos se ha descrito una correlación positiva entre el índice glicémico de la dieta y el nivel de grasa intramuscular (Sahyoun et al, 2005). Aunque teóricamente la lipogénesis en tejidos musculares está sometida al mismo tipo de regulación que en tejidos adiposos, existe muy poca información relativa a los mecanismos que regulan la lipogénesis y su interacción con los carbohidratos de la dieta.

2.4. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO GRUESO

Desde los primeros días de vida, todo el tracto digestivo de los animales monogástricos está colonizado por diferentes especies bacterianas que conforman la microbiota intestinal y que son cuantitativamente más importantes en la porción distal del intestino delgado y en todo el intestino grueso. A lo largo de estómago y del intestino delgado se producen simultáneamente los dos tipos de digestión, la enzimática que es predominante, y la microbiana que es minoritaria (Bach Knudsen et al, 1993). Sin embargo, en el tramo distal del intestino delgado la cantidad de amilasa endógena presente disminuye drásticamente, mientras que la actividad enzimática microbiana se incrementa, incluidas proteasas bacterianas que hidrolizarán la amilasa pancreática en ciego y colon.

En el cerdo, el tránsito a través del intestino grueso es considerablemente más lento (20-40 h) que a través del estómago e intestino delgado (2-16 h) (Low, 1993), lo que determina la fracción más prolongada del tiempo medio de permanencia del alimento en el tracto gastrointestinal. Los principales mecanismos de control del tránsito en el intestino grueso son el llenado a partir del íleon, el volumen de la digesta y los productos de la fermentación. En concreto, se ha demostrado (Calvert, 1989) que la adición de almidón resistente a la dieta incrementa el tiempo medio de permanencia de la digesta en intestino grueso. La hipertrofia del órgano como consecuencia de una llegada superior de sustrato puede estar justificada por la necesidad de retener la digesta y la flora el tiempo suficiente para aprovechar la energía del almidón que no es digerido en el intestino delgado. Este aprovechamiento es menor cuanto mayor es la cantidad de almidón resistente administrada, debido probablemente, a un compromiso entre la capacidad de fermentación y los costes asociados a la hipertrofia del tracto gastrointestinal posterior (Mathers, 1997; tabla 2.5.).

Tabla 2.5. – Peso de los compartimentos del tracto gastrointestinal posterior y digestibilidad aparente total de la MO de ratas alimentadas con raciones que contenían de 0-240 g/kg de almidón resistente de patata /kg de ración.¹

Almidón de patata en la dieta (g/kg)	0	80	160	240	<i>p</i>
Pesos compartimentos digestivos llenos (Kg)					
Colon	2,01	2,50	2,45	3,85	**
Ciego	1,87	4,15	6,06	9,45	***
Dig. Aparente de la MO	0,94	0,93	0,91	0,91	**

¹ Adaptado de Mathers, 1997

2.4.1. Población microbiana

La presencia de microorganismos en el tracto digestivo es un hecho ineludible con consecuencias tanto favorables como desfavorables en algunos aspectos. Entre estas últimas, en el intestino delgado la flora microbiana puede competir con el animal huésped por los nutrientes fácilmente digestibles de la ración y al mismo tiempo producir compuestos tóxicos (experimentalmente se ha demostrado que más del 6% de la energía neta de la ración del cerdo puede perderse debido a la fermentación microbiana en el intestino delgado; Vervaeke, 1979). Sin embargo, como aspecto

favorable, la fermentación en el intestino grueso permite la extracción de una fracción de energía a partir del alimento que no ha sido digerido en el intestino delgado.

La densidad bacteriana en el tracto digestivo posterior es numéricamente elevada, con valores de entre 10^{10} - 10^{11} UFC/g digesta tanto en el caso del cerdo (Moore et al., 1987) como en humanos (Hill, 1995). Las bacterias constituyen entre el 40 y el 55% del residuo seco de las heces (Cummings y MacFarlane, 1991) y presenta una elevada diversidad. En humanos se han identificado más de 40 géneros y sobre 400 especies (Gibson y Roberfroid, 1995) mientras que en el cerdo la cantidad de especies es superior a 500. Los microorganismos numéricamente mayoritarios son anaerobios estrictos, incluyendo bacteroides, bifidobacteria, eubacteria, streptococci y lactobacilli, mientras que en menor densidad pueden ser encontrados otros microorganismos, como las enterobacterias. Normalmente, el género bacteroides es el más numeroso y puede suponer más del 30% del total.

El intestino de todos los animales es estéril en útero y se coloniza durante el nacimiento por microorganismos maternos de origen vaginal o anal (Mevissen-Verhage et al, 1987). La colonización es un proceso dinámico, siendo las enterobacterias y estreptococos predominantes durante los primeros 3 días de vida ($\sim 10^{11}$ cfu/g; Mitsuoka, 1996). Las bifidobacterias aparecen en heces aproximadamente a los 2 días de vida y son la especie dominante a partir de los días 4-5. En el momento del destete, en respuesta al cambio dietético, las bifidobacterias y lactobacilos disminuyen dando lugar a un perfil más similar al del animal adulto (Mitsuoka, 1996).

Los principales mecanismos de control cuantitativo y cualitativo de la microflora son el tipo y la cantidad de substrato, las condiciones ambientales (principalmente el pH y la concentración de los productos resultantes de la fermentación), y también el proceso de mezcla y tiempo de retención de la digesta. Sin embargo, poco se conoce acerca del peso de la genética sobre la consolidación del perfil de la microbiota. Un estudio de dos razas diferentes de cerdos (Chino e híbrido comercial americano) demostraron que era la dieta y no la raza el factor más determinante en la selección de la flora y su actividad (May et al, 1993).

La información disponible sobre la ecología intestinal es limitada, y hasta el momento ha estado sujeta a las técnicas microbiológicas clásicas. Estas técnicas, a parte de su laboriosidad, presentan limitaciones importantes, como son la selección de cepas en función de su facilidad de cultivo en sistemas convencionales. Actualmente, las nuevas

técnicas de biología molecular van a facilitar los avances en el conocimiento de la microbiota. Por ejemplo, en un estudio microbiológico de cultivo en placa de heces humanas, se demostró que a 21 días de vida más del 98% de las bacterias cultivables eran bifidobacterias y lactobacilos. Sin embargo, el análisis de las mismas muestras con una PCR específica de género del rRNA 16s demostró que no había cantidades significativas de bifidobacterias, mientras que los lactobacilos representaban solamente el 25% del total (Sghir et al, 1998).

2.4.2. Substratos fermentables

Los substratos mayoritariamente utilizados por la microflora intestinal provienen de los componentes de la dieta no absorbidos, principalmente carbohidratos (formados por la fracción de almidón resistente, los azúcares libres no absorbidos y los polisacáridos no amiláceos). No obstante, son también susceptibles de fermentación las proteínas endógenas y dietéticas, y las sales biliares (Edwards y Parrett, 1996). Algunos microorganismos crecen a partir de productos intermedios de la fermentación como H₂, lactato, succinato, formato y etanol, y los convierten a AGV (MacFarlane y Gibson, 1992). Otros microorganismos metabolizan CO₂, liberando CH₄ (Miller y Wolin, 1986) o convirtiendo el CO₂ en acetato (Durand y Bernalier, 1995). La excreción de CH₄ en aire expirado, refleja la actividad metanogénica en el colon (Pitt et al, 1980), pero solamente se produce en animales colonizados con un microorganismo particular (*Methanobrevibacter smithii*) a una concentración superior a 10⁸ cfu/g de heces secas (Miller y Wolin, 1986).

Los mayores niveles de fermentación y proliferación bacteriana se producen en las porciones proximales del intestino grueso, donde hay mayor disponibilidad de sustrato. Posteriormente disminuyen a lo largo del intestino grueso conforme desaparecen los carbohidratos que se convierten en un factor limitante del crecimiento bacteriano, desviando la fermentación a la proteína (Annison y Topping, 1994). Entre los diferentes carbohidratos, los que tiene estructura más simple y mayor solubilidad (almidón, pectinas o β-glucanos) son los primeros en ser degradados por fermentación y desaparecen prácticamente en su totalidad, mientras que los más insolubles y de estructura más compleja (arabinoxilanos, hemicelulosa y celulosa) no se digieren totalmente y aparecen en cantidades variables en las heces (Bach Knudsen et al, 2000). Topping et al (1993), administraron un producto rico en polisacáridos no amiláceos (arroz con cascarilla) a cerdos de engorde, mientras que Marsono et al (1993) administraron un producto rico en almidón resistente (alubias). En ambos casos, los resultados obtenidos (tabla 2.6.), reflejaron un descenso de la producción de AGV a lo largo del tracto digestivo posterior. No obstante, en los cerdos

alimentados con alubias, la concentración de AGV era superior en el colon proximal pero decaía más rápidamente que en los animales alimentados con arroz con cascarilla. Estos resultados parecen reflejar que la fermentación del almidón resistente es más rápida que la de los PNA.

Tabla 2.6. – Pool de AGV en el colon de cerdos alimentados con alubias o arroz con cascarilla.

Ingrediente	Colon proximal	Colon medio	Colon distal
	Pool (mmol)		
Alubias ¹			
Acetato	13,9	3,2	0,8
Propionato	6,1	1,5	0,4
Butirato	1,4	0,5	0,1
Arroz con cascarilla ²			
Acetato	10,2	5,8	1,5
Propionato	4,3	2,7	1,2
Butirato	1,5	1,2	0,5

¹ Adaptado de Marsono (1993)

² Adaptado de Topping (1993)

De este modo, en animales adultos y tras un periodo de adaptación adecuado el almidón resistente se fermenta casi totalmente en colon proximal (Lu et al, 1995). El periodo de adaptación es necesario para permitir la hipertrofia del tracto digestivo posterior en respuesta a la llegada de sustrato fermentable (Mathers et al, 1997; Pluske et al, 1998) con el fin de incrementar el tiempo de permanencia de la digesta y también para permitir que la microflora se adapte a la fermentación del nuevo sustrato. Brunsgaard et al (1995) demostró en ratas que era necesario más de un mes para obtener una fermentación estable de almidón retrogradado, ya que el contenido de glucosa fecal seguía disminuyendo tras 8 semanas de ingestión del almidón resistente. Una observación similar fue obtenida por Faulks et al (1989) utilizando almidón de guisante. Estos autores observaron una disminución gradual en el contenido fecal de almidón de guisante durante los 18 días de su experimento. Por su parte, Le Blay et al (1999) demostraron en ratas que la producción de butirato como consecuencia de la fermentación de almidón crudo de patata, se incrementaba incluso tras 6 meses de experimento. Los largos periodos de adaptación descritos, sugieren que el incremento en la capacidad fermentativa es resultado de la selección progresiva de poblaciones bacterianas específicas de sustrato y no de la inducción de enzimas

amilolíticos por parte de la microflora existente. Aunque se ha demostrado que algunas bacterias pueden ser inducidas a expresar enzimas en función del sustrato disponible (Tulung et al, 1987), en el caso particular de las amilasas la inducción se lleva a cabo en pocas horas cuando el almidón está presente (Macfarlane et al, 1990). De esta forma, se ha demostrado que el almidón resistente produce una selección en la microflora intestinal en que se promueve la proliferación de bifidobacterias y lactobacillus en ratas (Kleessen et al, 1997), cerdos (Brown et al, 1997) y humanos (Sharp y Macfarlane, 2000).

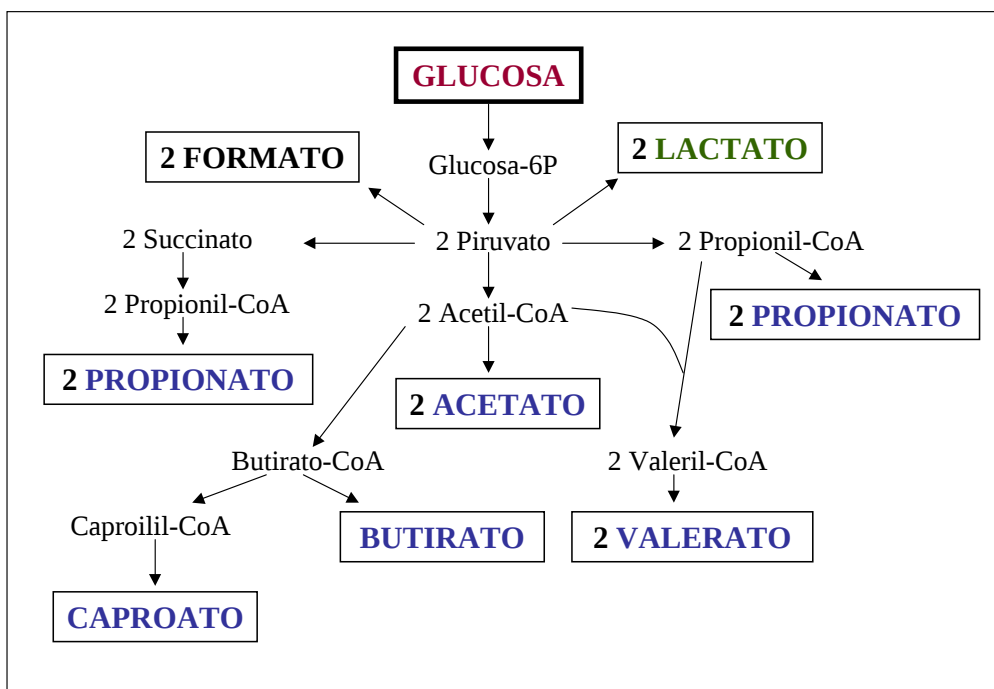
La fermentación del almidón resistente también depende de posibles interacciones con otros nutrientes de la dieta, como los PNA. Los PNA tienen elevada capacidad de retención de agua, y son capaces de acelerar el tránsito de la digesta en intestino grueso (Key y Mathers, 1993), dificultando la fermentación del almidón, como lo demuestran estudios de Young et al (1996), en que la adición de PNA incrementó la excreción fecal de almidón. Govers et al (1999) demostraron en cerdos que la adición de salvado de trigo, desplazaba la fermentación del almidón resistente de colon proximal a colon distal. Los mecanismos por los cuales la fibra inhibe o retrasa la degradación del almidón están relacionados con la viscosidad de la digesta, el tiempo de tránsito y probablemente a una inhibición directa de las α -amilasas.

2.4.3. Productos de la fermentación

La reacción de fermentación básica en colon es similar a la que tiene lugar en los herbívoros obligados: hidrólisis de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos a sus azúcares constituyentes, que serán fermentados resultando en un incremento de la biomasa (Savage, 1986). La hidrólisis de carbohidratos es realizada por hidrolasas bacterianas que tienen capacidad de digerir carbohidratos indigestibles para los enzimas endógenos intestinales. La fermentación proporciona energía metabolizable para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos, además de los productos de su metabolismo. El nitrógeno para la síntesis proteica microbiana proviene tanto de la urea (por la vía de la ureasa), como de restos de proteínas no digeridas o secreciones endógenas. Los principales productos de la fermentación son AGV (mayoritariamente acético, propiónico y butírico), gases (CO_2 , CH_4 y H_2) y calor. La reacción general de la producción de AGV a partir de una hexosa se presenta en la figura 2.7. y corresponde a la ecuación estequiométrica definida por Cummings (1997):

$$59 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 38 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 60 \text{ CH}_3\text{COOH} + 22 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 18 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 96 \text{ CO}_2 + 268 \text{ H}^+ + \text{calor} + \text{biomasa bacteriana}.$$

Figura 2.7. – Esquema de los posibles productos obtenidos a partir de la fermentación de una unidad de glucosa.



Los datos obtenidos in vitro de la fermentación de diferentes polisacáridos, e incluso de diferentes ingredientes (tabla 2.7.) habituales en la alimentación de monogástricos (Casterline et al, 1997; Ferguson y Jones, 2000) indican que el balance entre los AGV mayoritarios (acetato > propionato > butirato) coincide con el previsto por la ecuación de Cummings (1997). A parte de los AGV mayoritarios, se encuentran en menor cantidad otros ácidos orgánicos como el lactato, succinato o los AGV ramificados (como isobutírico e isovalérico) generados a partir de aminoácidos (Macfarlane et al, 1986). Otros productos de fermentación de las proteínas (amoníaco, aminas, fenoles e indoles), pueden tener efectos negativos sobre la salud de las células epiteliales (Bingham, 1990), por lo que se ha sugerido disminuir la fermentación proteica a partir de la adición de carbohidratos de reducida digestibilidad en intestino delgado (Jensen, 2001).

Tabla 2.7. – Producción de AGV tras 24 h de fermentación *in vitro* de diferentes sustratos (mmol / g sustrato).

Sustrato	Acético	Propiónico	Butírico	Ramificados	Total
Sacarosa ¹	2,43	2,18	1,25	0,54	6,4
Rafinosa ¹	2,29	1,72	0,57	0,11	4,7
Estaquiosa ¹	2,36	1,86	0,72	0,36	5,3
Almidón ^{1/2}	1,67 / 2,39	1,06 / 0,96	0,56 / 1,00	0,11 / -	3,8 / 4,4
Almidón resistente ²	1,16	0,72	0,94	-	2,8
Pectina ^{1/2}	1,90 / 5,18	0,90 / 0,76	0,20 / 0,57	0,0 / -	2,9 / 6,5
β-glucanos ²	2,41	1,69	1,44	-	5,54
Celulosa ¹	0,63	0,79	0,08	0,0	1,5
Ingredientes²:					
Maíz	0,76	0,21	0,16	-	1,1
Trigo	0,62	0,36	0,11	-	1,1
Avena	1,32	0,96	0,38	-	2,7
Guisante	1,46	0,42	0,11	-	2,0
Soja	1,19	1,14	0,22	-	2,6

¹Ferguson y Jones, 2000

²Casterline et al, 1997

A partir del estudio del patrón de fermentación in vitro de diferentes polisacáridos, se ha demostrado que el almidón es el sustrato que genera una mayor proporción molar de butirato (tabla 2.8.). Sin embargo, en la tabla también se observa que no todos los almidones generan un mismo patrón de fermentación. Martin et al (1998) examinaron in vitro la fermentación de varios tipos de almidón resistente con inóculo de cerdo y comprobaron que el almidón crudo de patata generaba más butirato (25% del total de AGV) que el almidón retrogradado (14%) y el almidón de maíz (14%). A su vez, Lehmann et al (2002) obtuvo una elevada proporción de butirato (34%) a partir de la fermentación de almidón de banana retrogradado. Estos resultados sugieren que la afirmación general de que se genera más butirato en la fermentación de almidón que de otros polisacáridos debe ser matizada. La representatividad de los estudios in vitro, se puede ver comprometida por su incapacidad en reproducir la cinética del flujo de almidón en los diferentes compartimentos del intestino grueso, la cual puede condicionar el perfil de AGV resultante de la fermentación. De hecho, en los animales rumiantes la fermentación de almidón está generalmente asociada con incrementos en la presencia de propionato, y en menor medida de butirato. En un estudio en ratas (Mathers et al, 1997) demostraron que la inclusión de 80g/kg de almidón crudo de patata incrementaba la proporción molar de butirato en ciego en un 70% respecto a la dieta control. Sin embargo, mayores aportes de almidón de patata (160 y 240 g/kg) disminuyeron la proporción de butirato, reflejando una respuesta curvilínea a la dosis de almidón resistente. Estos resultados indican que el tiempo de tránsito puede ser un factor determinante en el patrón de AGV. Los autores sugieren en este estudio que cuando el flujo de almidón superó la capacidad de adaptación anatómica del intestino grueso, el tránsito fue demasiado rápido para permitir la fermentación completa del almidón, seleccionándose una flora acetogénica. En cambio, cuando el tránsito permitió la completa fermentación del almidón pudo seleccionar una flora más butirogénica.

Tabla 2.8. – Patrón de producción de AGV a partir de diferentes sustratos.

Sustrato	% del total de AGV			Referencia
	Acetato	Propionato	Butirato	
Almidón de trigo	56	25	17	1
Almidón de maíz	62	21	16	1
Almidón de guisante	62	21	15	1
Almidón de patata	55	19	25	1
Almidón de banana	55	14	31	2
Almidón de banana retrogradado)	49	17	34	3
Salvado de avena	57	21	23	4
Salvado de trigo	57	15	19	4
Celulosa	61	20	19	4
Guar gum	59	26	11	4
Pectina	75	14	9	4
Ispaghula	56	26	10	4

¹ Martin et al (1998)

² Langkilde et al (2002)

³ Lehmann et al (2002)

⁴ Kritchevsky (1995)

Elsden et al (1946) demostró que tanto en especies rumiantes como omnívoras la concentración de AGV descende a lo largo del tracto digestivo posterior. Varios autores han demostrado este perfil en el cerdo (Back Knudsen et al, 1993; Bird et al, 2000; Cummings et al, 1987; Glitsø et al, 1998; Marsono, 1995; Martin et al, 1998; May et al, 1993; Olesen et al, 1994; Topping et al, 1993). Aunque es variable en función de la dieta, la concentración máxima de AGV totales se encuentra en colon proximal, con valores entre 150-250 mM desde donde descende a lo largo del tracto digestivo hasta alcanzar valores de 20-70 mM en colon distal (tabla 2.9.).

Tabla 2.9. – Concentración de AGV y butirato (en paréntesis) en los diferentes compartimentos de intestino grueso de cerdos alimentados con diferentes fuentes de fibra y almidón resistente.

Estudio	Fuente Carbohidratos	de Fibra	Compartimiento de intestino grueso			
			Ciego	Colon proximal	Colon medio	Colon distal
		(g/día)	(mmol/ kg contenido)			
Bach-Knudsen et al (1991) ¹	Harina de trigo	62 ²	100	90	60	60
	Avena laminada + salvado de avena	194	145	125	90	60
Cummings et al (1987)	Dieta de cerdo engorde	ND	83	ND	114	70
			(mM)			
Fleming et al (1989)	Alubias	63 ³	110 (9)	ND	ND	ND
	Salvado	66	140 (11)	ND	ND	ND
		(g/kg alimento)	(mmol/ kg contenido)			
Glitsø et al (1998)	Arroz entero	156 ²	156	123	70	54
	Pericarpio de arroz	177	112	107	77	70
	Aleuroma de arroz	180	164	160	122	74
	Endospermo de arroz	94	151	104	82	57
Morales et al (2002b)	Maíz	754	171	187 (20)	176	137 (18)
	Sorgo + bellota	400	164	180 (22)	152	124 (20)
		(g/día)	(mM)			
Marsono et al (1993)	Arroz blanco	20 ²	82 (8)	78 (6)	36 (3)	25 (2)
	Arroz blanco + salvado de arroz	43	69 (5)	77 (8)	52 (6)	30 (4)
	Arroz entero	37	72 (5)	96 (9)	87 (10)	65 (8)
Bird et al (2000)	Arroz blanco + salvado de arroz	33 ²	69 (4)	43 (4)	32 (7)	21 (2)
	Arroz entero	33	63 (4)	81 (6)	72 (8)	63 (9)
Topping et al (1993)	Salvado de trigo, bajo en fibra	14 ²	70 (8)	66 (9)	50 (7)	19 (2)
	Salvado de trigo	44	131 (13)	94 (12)	85 (12)	52 (5)
	Alubias	45	124 (6)	139 (9)	80 (7)	65 (6)
	Salvado de avena	42	92 (8)	97 (12)	73 (10)	39 (5)
			(mmol/ kg materia seca)			
Stanogias y Pearce (1985)	Salvado de trigo	75 ⁴	ND	181	ND	ND
		150	ND	356	ND	ND
		300	ND	458	ND	ND

ND: no disponible. ¹Valores interpolados a partir de gráfico. ²PNA más lignina. ³Fibra bruta. ⁴ Fibra neutro detergente.

2.4.4. Consecuencias fisiológicas del almidón resistente en intestino grueso

2.4.4.1. Efecto del almidón resistente sobre la masa fecal

En general, la fibra dietética acelera el tránsito y revierte la constipación intestinal a partir del incremento de la masa fecal (Lewis y Heaton, 1997). En humanos, el incremento de la masa fecal y la aceleración del tránsito asociada, se han relacionado con una disminución en el riesgo de carcinoma colorectal (Topping y Clifton, 2001) debido a que se diluyen las posibles toxinas y carcinógenos, y además se reduce el tiempo de contacto entre estos compuestos y la mucosa colónica. Los ingredientes menos fermentables, y con un mayor contenido en celulosa o arabinosilanos insolubles, como el salvado de trigo que solo se fermenta en un 50% (Nyman et al, 1986), son los que incrementan en mayor medida la masa fecal. El almidón resistente, debido a su elevada fermentabilidad, produce un incremento de la masa fecal variable pero muy inferior al del salvado de trigo. En la tabla 2.10. se presentan los resultados de la masa fecal, pH y AGV obtenidos a partir de la administración de diferentes almidones. Los resultados reflejan el poco aporte relativo que tiene el almidón resistente en la masa fecal, que se ha cuantificado entre 1-1.7g de heces adicionales por gramo de almidón resistente consumido (Cummings et al, 1996; Noakes et al, 1996; Phillips et al, 1995; van Munster et al, 1994). La elevada variabilidad entre resultados es consecuencia de la dosificación, diferencias entre tipos de almidón resistente, y a la interacción entre la fermentación del almidón y los PNA,. Cummings et al (1996) describió que el almidón de patata y el de banana verde incrementaban el peso fresco de las heces en 1.6 y 1.7 g/g, respectivamente. Los efectos del almidón resistente, parecen estar sujetos a la fuente de almidón, ya que el almidón retrogradado, obtenido a partir de trigo o de almidón rico en amilosa provocó incrementos de 2.4 y 2.7 g/g respectivamente. En conjunto, estos efectos son inferiores a los observados con PNA, que incrementan tanto la materia fresca como la materia seca excretada, mientras que el almidón resistente afecta solo la materia seca. Por lo tanto, el impacto del almidón resistente sobre el incremento de la masa fecal, es reducido y comparable a otros carbohidratos muy fermentables como son los de legumbres y pectinas (Cummings, 1997), fructooligosacáridos o inulina (Frommel et al, 1995).

Tabla 2.10. – Cambios en variables fecales observadas en humanos alimentados con almidón resistente.

Referencia	Dietas	Masa Fecal (g)	pH	AGV totales (mM)
van Munster et al (1994)	Control	119	6.6	87.8
	RS ₂	147	6.7	89.6
Noakes et al (1996)	Salvado de avena	100	6.22	101.1
	Almidón rico en amilosa	108	6.18	119.2
	Almidón bajo en amilosa	109	6.4	100.6
Phillips et al (1995)	Nivel bajo de AR	138	6.3	79.0
	Nivel alto de AR	197	6.9	99.5
Jenkins et al (1998)	Nivel bajo en fibra	163	ND	102.8
	Almidón resistente	185		107.9
	Salvado de trigo	258		108.1
				(mmol/kg MF)
Cummings et al (1996)	Almidón de trigo	153	ND	83.4
	Almidón de maíz	161		85.7
	Almidón de patata	151		99.7
	Almidón de banana	161		97.5
	Salvado	201		77.1

ND: no disponible. AR: Almidón resistente.

2.4.4.2. Efecto del almidón resistente sobre la biodisponibilidad de minerales

Es conocido que el calcio y el magnesio son significativamente absorbidos en intestino grueso (Hardwick et al, 1990). La contribución del intestino puede representar hasta el 15-20% del Ca y Mg absorbidos (Mitamura et al, 2004). Diversos estudios en ratas (Ohta et al, 1995; Delzenne et al, 1995) han demostrado que la administración de carbohidratos fermentables incrementa la absorción de calcio y magnesio a partir de diferentes mecanismos. En primer lugar los AGV reducen el pH cecal de tal forma que se incrementa la solubilidad mineral y mejora la absorción de minerales. Además, los AGV pueden establecer enlaces con los minerales incrementando directamente su absorción. La hipertrofia de ciego observada en ratas en respuesta a la administración

de almidón resistente puede incrementar la superficie de absorción y en consecuencia mejorar también la absorción de minerales (Younes et al, 1996, 2001; López et al, 1998). El mismo efecto ha sido descrito en cerdos (Bird et al, 2000), en que la administración de arroz integral incrementó la producción de AGV y a su vez disminuyó la concentración de calcio a lo largo del colon. Esta disminución en la concentración de calcio puede ser indicativa de una mayor absorción aunque no se puede descartar un efecto de dilución debido al incremento en la masa fecal inducido por la administración de carbohidratos fermentables.

2.4.4.3. El almidón resistente como prebiótico

Gibson y Roberfroid (1995) definieron prebiótico como "sustancia específica para el crecimiento de bacterias potencialmente beneficiosas en el colon". En estudios in vitro, se ha demostrado que el almidón resistente puede actuar como un prebiótico, ya que sirve como sustrato para el crecimiento de bifidobacterias (Brown et al, 2000). Además, in vivo se ha observado que el almidón resistente protege las bifidobacterias en su paso por el tracto gastrointestinal superior (Wang et al, 1999).

En estudios clínicos, se ha demostrado que el almidón resistente reduce la pérdida de fluidos y disminuye el tiempo de recuperación de cerdos infectados con *Brachyspira hyodysenteriae* (Hampson et al, 2000) y de humanos con diarrea por cólera (Ramakrishna et al, 2000). Se considera que parte de los efectos del almidón resistente están mediados por los AGV, ya que incrementan la absorción de fluidos (Topping et al, 2003). Por otra parte, la fermentación del almidón resistente en intestino grueso puede modificar variables del ecosistema intestinal, generando un medio inapropiado para la proliferación de bacterias patógenas como *B. hyodysenteriae* o *Vibrio cholerae*, y en cambio favorecer el crecimiento de bacterias potencialmente beneficiosas como bifidobacterias y *Lactobacillus* (Brown et al, 1998).

Sin embargo, otros autores (Pluske et al, 1996) han relacionado la presencia de carbohidratos fermentables en la ración (almidón resistente incluido) con una mayor predisposición de los cerdos en crecimiento a sufrir disentería o colibacilosis clínica tras una infección experimental. Las contradicciones entre resultados experimentales generan numerosas incertidumbres sobre la influencia de los carbohidratos, y la dieta en general, en las patologías digestivas. Si bien, es posible que estos resultados estén estrechamente condicionados para las características propias de la microbiota intestinal, el estado sanitario y las condiciones experimentales en cada caso.

2.4.4.4. Metabolismo energético de los ácidos grasos volátiles

El aprovechamiento energético de los carbohidratos por fermentación es inferior al obtenido por hidrólisis enzimática debido básicamente a las pérdidas de energía en forma de gases (CO_2 , H_2 , CH_4) y al gasto de energía para el propio mantenimiento y crecimiento de la flora microbiana. Bergman (1990), cuantificó las pérdidas energéticas de fermentación de los carbohidratos en un 25%, de tal forma que los AGV contendrían el 75% del contenido energético de los carbohidratos. Jensen (2001) estimó un menor porcentaje (inferior a un 60%) para la energía disponible para el animal a partir de la fermentación de los carbohidratos. Valoró las pérdidas en un 6% en forma de calor, un 18% en la producción de gas (principalmente CH_4) y cerca de un 20% incorporado a la biomasa bacteriana. Cálculos estequiométricos realizados por Roberfroid et al (1993) sugieren que la fermentación anaerobia proporciona aproximadamente una ineficiencia de utilización de la energía contenida en los carbohidratos del 25-30% respecto a la hidrólisis enzimática. En el caso concreto del almidón, Livesey (1990) estimó que de la glucosa liberada tras la hidrólisis del almidón en intestino delgado se obtienen 3,9 Kcal/g, mientras que a partir de su fermentación microbiana se obtienen tan solo 1,8 Kcal/g, lo que supone una eficiencia del 45% de la fermentación respecto a la hidrólisis enzimática.

En los diferentes sistemas de valoración energética para el cerdo la posible presencia de almidón resistente en los cereales o leguminosas es ignorada; salvo para el caso del almidón de patata (Doorenbos et al, 2004). Así pues, se otorga el mismo valor energético a todo el almidón de la dieta, independientemente de su grado de resistencia a la hidrólisis enzimática. Sin embargo, en diferentes estudios se han determinado cantidades elevadas de almidón en la digesta ileal, en función de su origen botánico o procesado (Anguita et al, 2006a ; Svihus et al, 2005; Topping et al, 1997) que pondrían en cuestión esta simplificación. Por lo tanto, sería posible mejorar la estimación de la valoración energética de la dieta introduciendo en las ecuaciones de cálculo un factor que permitiera matizar el porcentaje de almidón que será fermentado en lugar de degradado enzimáticamente. En la práctica, la cantidad de almidón resistente dependería del ingrediente pero también del procesado tecnológico.

A parte de la eficiencia energética de la fermentación de los carbohidratos, cabe destacar que los diferentes productos resultantes de la fermentación, siguen patrones de absorción y utilización específicos. Así por ejemplo, el lactato está presente en sangre portal de forma muy temprana después de la ingestión de alimento, indicando

que su producción y absorción tiene lugar en los compartimentos más proximales del tracto gastrointestinal, estómago e intestino delgado (Bach Knudsen et al, 2000).

Por otro lado, la absorción de los AGV se produce a lo largo de todo el tracto digestivo en función de su concentración en la digesta y del pH del medio (Bergman, 1990). Al menos el 60% de la absorción se lleva a cabo por difusión simple de los AGV protonados, implicando la hidratación del CO₂ luminal, mientras que el resto es absorbido por captación celular de los AGV ionizados con cotransporte de Na⁺ y K⁺ (Fleming et al, 1991). Sin embargo, el nivel de AGV absorbidos es menor al producido debido a la rápida oxidación metabólica por los tejidos (Giusi-Perier et al, 1989; Jensen, 2001). Además, existen diferencias en la absorción de los diferentes AGV, como reflejan las claras diferencias en el perfil de AGV absorbidos con relación a los producidos en el lumen digestivo, debido a que cada uno presenta destinos y utilidades metabólicas diferenciadas. En el caso del butirato, la mayor parte es oxidado a CO₂ o a cuerpos cetónicos en la mucosa del colon por lo que su presencia en circulación periférica se reduce. El propionato también es parcialmente metabolizado por la pared intestinal, pero la mayor parte es absorbido y llega al hígado vía sangre portal, donde es utilizado como recurso gluconeogénico. Como consecuencia, en circulación periférica el acetato representa entre el 90-98% de los AGV presentes (Bergman, 1990; Yen et al, 1991; tabla 2.11.) ya que es el que supera en mayor medida la barreras intestinal y hepática.

Tabla 2.11. – Concentraciones de AGV en colon, vena porta y sangre arterial.

	Total AGV	Perfil (%)		
	(mM)	Acético	Propiónico	Butírico
Colon ⁽¹⁾	210	55	34	11
Vena porta ⁽²⁾	0,75	63	29	8
Sangre arterial ⁽²⁾	0,17	90	6	4

¹ Argenzio y Southworth, 1975

² Rerat et al, 1987

2.4.4.5. Efectos intrínsecos de los ácidos grasos volátiles

2.4.4.5.1. *Acetato*

La fermentación microbiana en el tracto gastrointestinal contribuye al balance energético de todos los mamíferos, estimándose que el aporte energético de los AGV puede representar hasta el 25% de las necesidades energéticas de mantenimiento de los cerdos en crecimiento (Yen et al, 1991). En un estudio en nuestro laboratorio combinando la metodología *in vivo* con animales canulados e *in vitro*, Anguita et al

(2005a) ha estimado la contribución de la fermentación posterior a la energía disponible en cerdos en crecimiento alimentados con cantidades crecientes de polisacáridos no amiláceos. El incremento en la cantidad de PNA de valores de 77 a 240 mg/kg de MS determinó un descenso en la energía digerida a nivel ileal de 15 a 11 MJ/kg de MS, y un incremento en la participación de los AGV a la energía absorbida. El acetato, como principal producto de la fermentación microbiana y prácticamente el único presente en el torrente circulatorio, es responsable en gran medida de la contribución energética de los AGV al animal. Puede tener dos destinos metabólicos: la oxidación o la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, que está regulada mediante la acetil-CoA sintetasa (Bergman, 1990; Yen et al, 1991).

Sin embargo, no todos los tejidos tienen la misma afinidad para la utilización de acetato como sustrato energético. A partir de estudios isotópicos se ha estimado la que entre el 25 y 35% del acetato arterial es oxidado por el intestino, básicamente por los tejidos muscular y adiposo, y en menor medida por los tejidos epiteliales (Pethick et al, 1981). El resto del acetato circulante es utilizado en aproximadamente un 80% en tejidos periféricos, mayoritariamente músculo esquelético y tejido adiposo (Bergman, 1990).

No obstante, en los últimos años, de entre los posibles efectos locales determinados por los AGV destacan aquellos producidos fundamentalmente por el propionato y el butirato.

2.4.4.5.2. *Propionato*

Se ha demostrado que el propionato puede inhibir la síntesis de ácidos grasos en el hígado (probablemente por competición con el lactato), reduciendo la secreción de triacilglicerol (Nishina y Freedland, 1990). Además, el propionato puede estar involucrado en el control hepático de la síntesis de colesterol. Se ha propuesto la hipótesis de que la reducción en la concentración plasmática de colesterol observada tras la administración de carbohidratos no digestibles, es resultado de la inhibición de la síntesis de colesterol hepática vía propionato generado durante la fermentación en intestino grueso (Chen et al, 1984). En este sentido Cheng y Lai (2000) encontraron niveles de colesterol más bajos en suero e hígado de animales alimentados con almidón de arroz que con almidón de maíz (con menor cantidad de almidón resistente). Los autores, atribuyeron el efecto al incremento en la producción de propionato observado en la dieta de arroz. Sin embargo ambas dietas contenían niveles diferentes de almidón digestible, de tal forma que no se puede descartar un

efecto sobre la colesterolemia del nivel de energía absorbido o mediado por la respuesta en los niveles de insulina. De hecho, en estudios anteriores realizados con ratas libres de flora (Sacquet et al, 1983), se había observado un efecto similar sobre el colesterol tras la administración de un almidón rico en amilosa (con alto contenido en almidón resistente). En este caso, la ausencia de fermentación indica que el propionato puede no jugar un papel tan importante como se ha propuesto sobre el control de la síntesis de colesterol.

El propionato también puede afectar la circulación en intestino grueso. Mortensen et al (1991) demostraron *in vitro* que el propionato produce un efecto de dilatación de los vasos sanguíneos del intestino grueso; por lo que podría participar en la regulación del flujo sanguíneo observado en animales alimentados con fibra.

2.4.4.5.3. Butirato

El butirato es el ácido graso de cadena corta que mayor atención ha recibido en los últimos años. Constituye el principal sustrato energético de los colonocitos normales, proporcionándoles entre el 60 y 70% de sus demandas energéticas (Roediger, 1980; Luciano et al, 2002). Siendo el principal sustrato energético, resulta evidente que tiene efectos tróficos sobre la mucosa intestinal y por lo tanto ayuda a mantener su integridad estructural (Kripke et al, 1989).

En estudios *in vivo* se ha demostrado que el butirato inhibe la apoptosis tanto en rumen bovino (Mentschel et al, 2001) como en colon porcino (Claus et al, 2003; Mentschel y Claus, 2003) de enterocitos normales, favoreciendo la proliferación de las células integrantes de las mucosas. Sin embargo, el efecto contrario se ha descrito en células tumorales, en que el butirato induce una ralentización de la replicación celular y la apoptosis (Hague et al, 1993, 1995).

Por este motivo se considera que el butirato juega un papel fundamental en la prevención del cáncer de colon (Bingham, 1990). Estudios experimentales sugieren que los alimentos que promueven la formación de butirato en colon (ej. salvado de trigo) reducen la masa tumoral en modelos experimentales de cáncer (McIntyre et al, 1993). El almidón retrogradado rico en amilosa (AR3) y el almidón de patata (AR2) se han demostrado efectivos en la prevención de cáncer de colon en ratas tratadas con azoxymethane (Perrin et al, 2001) mientras que no se ha detectado ningún efecto con almidón de patata en ratas con carcinogénesis de colon inducida por 1,2-dimethylhydrazine (Sakamoto et al, 1996). Estas aparentes contradicciones parecen

poner de manifiesto que el posible papel de la fermentación del AR solo tiene lugar en las primeras fases del proceso de carcinogénesis.

En el caso concreto de la producción porcina, la reducción de la apoptosis inducida por el butirato puede tener un efecto indirecto sobre la acumulación de escatol en tejidos grasos, y en consecuencia sobre la aparición de olor sexual en la canal. El escatol se produce en intestino grueso, como producto de la fermentación del triptófano, proveniente principalmente de las células descamadas a la luz intestinal. Claus et al (2003) demostraron que la inhibición de la apoptosis debido a la presencia de butirato reduce la liberación al contenido digestivo de triptófano disponible para la fermentación, y en consecuencia disminuye los niveles de escatol en el contenido fecal, sangre periférica y depósitos grasos.

Aparte de su papel en la apoptosis, algunos experimentos han demostrado que la infusión directa de butirato en colon conduce a la remisión de colitis ulcerativas (Scheppach et al, 1992). En concreto, se ha demostrado que el almidón retrogradado tiene un efecto beneficioso en la remisión de la colitis en un modelo de inflamación inducida por sulfato sódico dextrano en rata (Moreau et al, 2003). Existe la hipótesis de que algunas colitis pueden ser resultado de un defecto en el metabolismo del butirato. Lo demuestran trabajos en que la infusión rectal de 2-bromo-octanoato, el cual inhibe la β -oxidación de ácidos grasos, reproduce los síntomas propios de la colitis (Roediger y Nance, 1986). A favor de esta hipótesis, también se ha demostrado que en los casos de colitis ulcerativas los niveles de butirato fecales son particularmente bajos y los de ácido láctico altos (Vernia et al, 1988).

En su conjunto, los diferentes trabajos descritos demuestran que el butirato es un nutriente esencial para el mantenimiento de una mucosa intestinal sana.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Resulta relativamente reciente (de finales de los ochenta, principios de los noventa) la aceptación de que no todo el almidón ingerido es hidrolizado y absorbido en intestino delgado. Asp et al (1992) definieron en humanos el concepto de almidón resistente. En alimentación humana, el almidón resistente ha cobrado un elevado interés en las poblaciones occidentales como estrategia para incrementar el consumo de fibra dietética y reducir la obesidad y la diabetes, pero también patologías digestivas como la constipación, diverticulosis y cáncer de colon.

En muchos de los estudios realizados para nutrición humana, se ha utilizado el cerdo como modelo experimental, porque tanto en términos anatómicos, como fisiológicos o de composición de la microbiota intestinal, es más parecido al hombre que cualquier otro modelo animal (Graham y Aman, 1986; Rowan et al, 1984; Miller y Ullrey, 1987). Sin embargo, la nutrición porcina aun no ha integrado el concepto de almidón resistente, justificado por su escasa relevancia cuantitativa. En general, los diferentes sistemas de valoración energética porcina, NRC (1998), INRA (Noblet et al, 2004), CVB (Doorenbos et al, 2004), sistema danés (Tybirk, 2004), asumen que la digestibilidad del almidón es total independientemente de su origen o procesado. En el caso concreto de la producción porcina, la presencia de almidón resistente en las dietas, no solamente puede tener consecuencias sobre la valoración energética de la ración, sino también sobre el metabolismo general del animal.

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar los principales cambios fisiológicos y metabólicos asociados a la introducción de almidón resistente en la dieta del cerdo en crecimiento. La incorporación de almidón resistente proporciona para el cerdo un modelo del aporte de cantidades crecientes de un sustrato potencialmente fermentable.

El desarrollo de este objetivo general se llevó a cabo mediante los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar los mecanismos de adaptación del tracto digestivo al aporte de almidón resistente durante el medio y largo plazo. Entre estas modificaciones adaptativas se evaluaron las modificaciones morfológicas del tracto digestivo, y los cambios de población y fermentación microbiana.
2. Evaluar los posibles efectos de la suplementación de almidón resistente sobre la absorción de nutrientes y parámetros relacionados con la salud intestinal.

3. Evaluar el efecto de la suplementación de almidón resistente sobre la síntesis de grasa corporal.

Para el desarrollo de estos objetivos se plantearon tres experimentos. En el primero de ellos se estudiaron los efectos digestivos y metabólicos de la inclusión de almidón resistente a la dieta de cerdos en crecimiento durante un periodo de 38 días. En este experimento las dietas se administraron de forma restringida con el fin de evitar variaciones en el nivel de consumo entre las dos dietas experimentales. En concreto se estudiaron los mecanismos de adaptación del tracto digestivo y de la microflora intestinal, así como el impacto del almidón resistente sobre la actividad enzimática de los enzimas lipogénicos.

En el segundo experimento, que se realizó simultáneo al primero, se utilizaron animales cateterizados para estudiar el efecto de la administración de almidón resistente sobre la glicemia e insulinemia posprandial, así como sobre el ritmo de aparición de glucosa y acetato a la circulación periférica.

En el tercer experimento también se administraron dos dietas que diferían en el contenido de almidón digestible, pero en este caso se ofrecieron en un régimen de alimentación ad libitum y durante un periodo de tiempo más prolongado (des de 21 a 93 kg de peso vivo). En este experimento se estudiaron los mecanismos de adaptación digestivos, así como la actividad y composición de la microbiota intestinal en respuesta a la administración de almidón resistente a largo plazo. También se estudiaron las consecuencias de la administración crónica de almidón resistente sobre parámetros relacionados con la morfometría intestinal y la absorción de nutrientes.

CAPÍTULO 4

**Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of
purine bases in growing pigs**

Journal of Nutrition (2003) 133: 134-139.

ABSTRACT

Male growing pigs were fed a diet containing 250 g/kg of native corn starch (CS; 26% amylose, 74% amylopectin) or 250 g/kg of raw potato starch (RPS), as examples of digestible starch and resistant starch (Type II), respectively. Whole-tract digestibilities of organic matter, crude protein and starch were greater in pigs fed CS than in those fed RPS through at least d 23 of the study. However, the values progressively increased in the RPS-fed pigs up to d 38, at which time the groups did not differ in organic matter and starch digestibility. The digestive tract and colonic digesta were heavier and colon length longer in pigs fed the RPS diet. Digestibility of starch in the ileum on d 38 was significantly lower in RPS-fed pigs, but rose from ileum to rectum; most starch was extensively fermented in the cecum and proximal colon. Purine base (PB) and short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in feces initially increased and then decreased beginning on d 4 for PB and on d 21 for SCFA. PB concentration in feces was greater in pigs fed RPS than in those fed CS. In the large bowel digesta, PB and SCFA concentrations increased from the ileum to the cecum and proximal colon and then fell in the distal colon. Pigs fed the RPS diet had a higher PB concentration in the middle colonic digesta and a greater SCFA concentration in the proximal colonic digesta than the CS-fed group. Adaptation of growing pigs to supplementary RPS required 5 wk, as reflected by whole-tract digestibility and PB and SCFA fecal excretion data.

4.1. INTRODUCTION

Microbial fermentation of carbohydrates in the large bowel (LB) of simple-stomached animals is a focus of considerable interest. In particular, the stable fermentation of carbohydrates has been shown to prevent pathogens or diarrhoea (Williams et al, 2001), and be of benefit in a variety of digestive and metabolic diseases, such as carcinogenesis in the colon (Govers et al, 1999), insulin resistance and diabetes (Higgins et al, 1996), and chronic renal or hepatic disease (Younes et al, 1997). Carbohydrates available for fermentation in the large bowel consist of non-starch polysaccharides, although starch and products of small intestine starch digestion (i.e., resistant starch, RS) are thought to contribute extensively to LB fermentation. For example, there is recent evidence that giving such RS orally to human patients with cholera increases fecal short-chain fatty acid (SCFA) concentration and shortens the duration of diarrhoea (Ramakrishna et al, 2000).

Methods to evaluate fermentation, especially those involving humans, are based on the measurement of breath gas (H_2 or CH_4) or SCFA in peripheral venous plasma or feces. Fermentation increases the fecal excretion of SCFA (Govers et al, 1999) and shifts nitrogen excretion from urine to feces (Tetens et al, 1996, Heijnen & Beynen, 1997). However, there have been contradictory results in fermentation studies that measure the excretion of SCFA and N in feces. For instance, more highly efficient microbial protein formation has been observed with poorer fermentable substrates, such as cellulose, compared with other more degradable carbohydrates (Kirchgessner et al, 1994), such as resistant starch. Similarly, Heijnen & Beynen (1997) provided evidence that retrograded RS, but not uncooked RS, shifts N excretion from urine to feces in pigs.

Numerous factors may influence fermentation of starch and production of SCFA in the large bowel. A number of studies have shown that the extent of RS fermentation can increase over time (Faulks et al, 1989; Le Blay et al, 1999). Adaptive responses may reflect long term adaptations of the intestinal flora (Le Blay et al, 1999) or the intestinal tract, through hypertrophy of the large bowel and increased retention times for digesta (Mathers et al, 1997). The present experiment was designed to study the adaptive responses of growing pigs over time to the intake of high amounts of resistant starch, using raw potato starch as reference material. Factors that are likely to affect the excretion of SCFA and microbial N in feces were also evaluated.

4.2. MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed at the Experimental Unit of the Universitat Autònoma de Barcelona and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution (CCAC, 1993). Purified starches [native corn starch (CS), 26% amylose, 74% amylopectin; raw potato starch (RPS), 20% amylose, 80% amylopectin] were purchased from Cerestar Iberica (Barcelona, Spain). As determined by enzymic analysis (Champ, 1992), CS contained 187 g/kg of resistant starch and RPS 637 g/kg.

4.2.1. Animals and diets

Twelve Landrace x Large White male growing pigs, 18.4 ± 1.0 kg (mean $\pm$ SD) live weight (LW), were purchased from La Balcona (Vic, Spain). On arrival, they were housed individually on slat bedding (six pigs) and in metabolic cages (six pigs), and administered a preexperimental ground and solid diet mainly composed of corn, soybean meal, dried whole whey, dried skim milk and fish meal. With an initial body weight of 27.4 ± 1.3 kg (mean $\pm$ SD), pigs in each location were randomly divided into two groups and offered two experimental ground diets, containing either 250 g/kg of CS or 250 g/kg of RPS. Diets were formulated (Table 4.1.) according to nutrient requirements of NRC (14*), that is, 13,690 kJ metabolizable energy (ME)/kg, 189.4 g CP/kg, 11 g lysine/kg, assuming a starch energy content of 16,720 kJ ME/kg. Diets were presented over a 38-d period at a rate of 0.90 of the estimated voluntary intake (NRC, 1998) in two equal meals at 0800 and 2000 h. Cr_2O_3 was included (15 g/kg) as an indigestible marker.

4.2.2. Experimental procedures

One fecal sample per pig was collected for analysis of SCFA concentration on d 0, 4, 7, 21 and 38, and purine base (PB) concentration on d 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28 and 38 after dietary presentation. Briefly, the pens were thoroughly cleaned early in the morning and, over the next 3 h, at least two samples of feces were taken and pooled. An amount of ~1 g was acidified with 1 mL of solution containing 50 g/L H_3PO_4 , 10 g/L of mercuric chloride and 50 mmol/L of 3-methyl valerate as internal standard, and stored at -20°C until analysis for SCFA concentration. The rest of the sample was freeze-dried and milled for analysis of PB. On d 8–10, d 15–17 and d 22–24, individual feces were sampled from the 12 pigs for digestibility estimations based on the marker ratio, and total urine was collected from the six pigs in the metabolic cages. Feces were dried at 60°C , ground (1-mm screen) and stored at room temperature for chemical analysis. Urine was collected in buckets containing 200 mL of 1 mol/L H_2SO_4 to keep pH < 2.

Urine weight and specific gravity were recorded daily and two subsamples (2%) were stored immediately at -20°C. On d 38, from 2 to 3 h after feeding, pigs were killed by an intravenous Na-thiobarbital injection (200 mg/kg LW). The abdomen was opened and the whole gut excised and weighed. Ileal digesta was sampled from a 300-mm length segment ~100 mm anterior to the ileal-cecal junction. The cecum; proximal, middle and distal colon; and rectum were ligated, excised and weighed. Digesta from the cecum, colon and rectum were sampled for analysis of SCFA as described for feces. Samples of ileum and large bowel digesta were freeze-dried and milled for analysis of PB and chromium. Portions of ~20 mm in length of cecum (10 cm caudal from the ileocecal valve) and middle colon (1.5 m from the cecum) tissue were placed in a saline fixative (100 mL formaldehyde/L saline) for measurement of the mucosa thickness. Finally, the voided cecum and colon were weighed, and the small intestine and colon length were measured.

Table 4.1. - Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets¹.

Diet	CS	RPS
Ingredients (g/kg)		
Corn starch	250	---
Raw potato starch	-	250
Ground barley	289	289
Soybean meal	325	325
Wheat mills	80	80
Tallow	21.6	21.6
DL-Methionine	1	1
Premix ²	24.3	24.3
Cr ₂ O ₃ ³	1.5	1.5
Nutrient analysis (g/kg DM)		
Crude protein	212.8	211.7
Crude fat	37.3	37.3
Crude fibre	50.7	49.9
Ash	57.0	59.2
Starch	392	398
Resistant starch	58.7	161.8
PNA [†]	171.1	173.6

¹.150 mg of Etoxiquin® as antioxidant and 500 mg de Luctamold® as fungicide per kg of feed were added to both diets.

².Premix provided the following per kg of diet: CaCO₃ 12.3g, CaHPO₄ 9g, NaCl 2g, vitamin A, 2,100 µg; vitamin D₃, 45 µg; tocopherol, 10 mg; vitamin K₃, 1 mg; thiamin, 1 mg; riboflavin, 4 mg; pyridoxine, 2 mg; cyanocobalamin, 20 µg; biotin, 10 µg; niacin, 18 mg; Ca-d-pantothenic acid, 10 mg; choline, 175 mg. Minerals: Fe, 80 mg; Zn, 110 mg; Cu, 90 mg; Mn, 50 mg; Co, 0.1 mg; I, 1 mg; Se, 0.2 mg. ³ Analytical (Carlo Erba®, Milan, Italy)

4.2.3. Analytical procedures

Chemical analysis of the diets and digesta were performed following the methods of the AOAC (1995) for dry matter, ash, crude protein and fat. Total starch of feed and digesta samples were measured by the method of Theander (1991). Briefly, starch was determined as glucose liberated after an enzymatic incubation with thermostable α -amylase (A-4551; Sigma, St. Louis, MO) for 1 h at 100°C, and amyloglucosidase (A-3514; Sigma) for 4 h at 60°C. Resistant starch was measured by the method of Berry (1986) modified by Champ (1992) as the part of starch not hydrolyzed by incubation with α -amylase for 16 h at 37°C. Hydrolysis products were extracted in 800 g/L ethanol and discarded. Resistant starch was then solubilized with 4 mol/L KOH and hydrolyzed with amyloglucosidase for 90 min at 65°C. The SCFA concentration in deproteinized feces and digesta was determined by GLC, following the method proposed by Jouany (1982). Chromium III oxide concentration in feed and digesta was determined by atomic absorption spectrophotometry following the method of Williams et al. (1962). Purine bases in digesta samples (40mg) were determined by HPLC (Makkar & Bekker, 1999) after their acid hydrolysis with 2 mL of 2 mol/L perchloric acid at 100°C for 1 h. Mucosa thickness was measured by optical microscopy. Fixed samples were dehydrated, embedded in paraffin wax, sectioned at 4 μ m, stained with hematoxylin and eosin and mounted on microscope slides.

4.2.4. Calculations and statistical analysis

Whole-tract and fractional digestibilities along the large bowel were calculated by the marker (Cr_2O_3) ratio method. Colonic transit time (TT, h) was estimated as the mass of Cr present in the organ divided by the mean daily chromium intake ($\pm$ SD) and multiplied by 24 (Goodlad & Mathers, 1987). Data were subjected to analysis of variance according to the general linear model (GLM) procedure of SAS (1996). Repeated measurements over time (digestibility, SCFA and PB in feces) and data obtained from different gut locations (fractional digestibilities, SCFA and PB in digesta) were analyzed by the repeated-measures model (MIXED-type TOEP) of SAS (1996), and LSMEANS follow-up test was used for comparison of means. A two-tailed P value of < 0.05 was considered significant.

4.3. RESULTS

4.3.1. Animal health and production

Pigs in both groups consumed the entire portion of food presented. The average daily gain of weight was 700 vs. 740 g/d (SEM, 28.0) and the feed:gain ratio was 2.30 vs.

2.17 (SEM, 0.091) for pigs fed RPS and CS, respectively. However, the weight of carcasses after removing the digestive tract was significantly lower in pigs fed RPS than those fed CS [44.7 kg vs. 48.4 kg (SEM), 6.08, $P < 0.03$].

4.3.2. Digestibility and urinary N excretion

Whole-tract digestibilities of organic matter, crude protein and starch were significantly higher in pigs fed CS than in pigs fed RPS (Table 4.2.). However, organic matter and crude protein digestibilities progressively increased in RPS-fed pigs from d 9 to d 38, and in CS-fed pigs from d 9 to d 16 after feeding, after which there were no further increases. Thus, at the 38-d time point, whole-tract digestibility of organic matter and starch were similar in CS- and RPS-fed pigs, but whole-tract digestibility of protein remained higher in CS-fed pigs. Daily excretion of N in the urine of pigs fed Diet CS (Fig. 4.1.) increased at 23 d after feeding ($P < 0.02$). The pigs fed Diet CS tended ($P < 0.10$) to excrete more urinary N than in those fed RPS on d 23.

Table 4.2. - Whole-tract apparent digestibility of organic matter (OM), crude protein (CP) and starch in growing pigs fed a diet with 250g/kg of corn starch (Diet CS) or 250g/kg of raw potato starch (Diet RPS)^{1,2,3}.

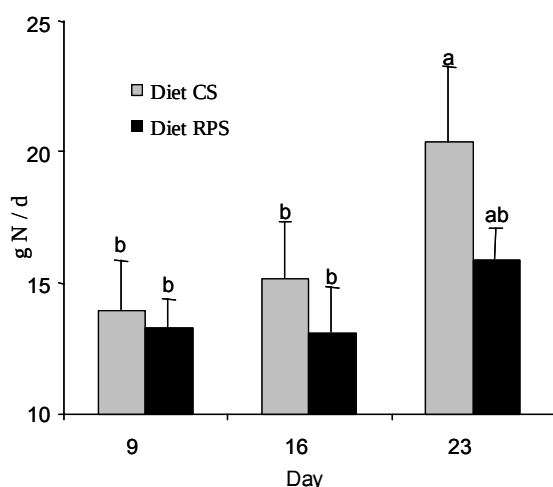
							Probability		
Time, d		9	16	23	38	SEM	Diet	Time	D x T
Diet									
OM									
	CS	83.4 ^{bc}	86.4 ^a	86.4 ^{ab}	85.6 ^{ab}	0.45	0.001	0.05	0.05
	RPS	77.8 ^d	79.1 ^d	80.4 ^{cd}	84.1 ^{ab}				
CP									
	CS	79.1 ^{bc}	84.9 ^a	83.7 ^a	83.2 ^{ab}	0.98	0.001	0.01	N.S.
	RPS	71.3 ^d	74.6 ^d	75.6 ^{cd}	78.4 ^c				
Starch									
	CS	99.7 ^a	99.8 ^a	99.9 ^a	99.9 ^a	0.93	0.01	0.001	0.01
	RPS	98.2 ^{ab}	96.6 ^{bc}	95.5 ^c	99.4 ^a				

¹ Values are means, n=6.

² Means not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

³ Probability; N.S. ($P \geq 0.05$).

Figure 4.1. - Daily excretion of N in the urine of growing pigs fed a diet containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM, n=3. Means with different letters differ, $P < 0.05$.



4.3.3. Purine base and short chain fatty acid concentrations in feces

Purine base concentration in feces (Fig. 4.2.A) ranged from 12.8 to 33.9 $\mu\text{mol/gDM}$ and was higher in pigs fed Diet RPS than CS ($P < 0.03$). Pigs fed CS and RPS similarly showed the highest PB concentration in feces on d 4, after which it decreased until d 14. As shown in figure 4.2.B, SCFA concentrations in feces were highest on d 7 and d 21, with little difference between dietary treatments.

4.3.4. Digestive tract and fermentation

The digestive tract removed on d 38 from pigs fed Diet RPS was significantly heavier than that from the CS group ($P < 0.05$, Table 4.3.). Differences occurred primarily in the colon compartment that, in pigs fed Diet RPS was longer ($P < 0.05$) and heavier, whether full ($P < 0.001$) or empty ($P < 0.05$), than in the CS group. However, the estimated retention times of digesta in the colon were similar (23.0 vs. 16.0 h; $P = 0.14$) in pigs fed RPS and CS, respectively. The pigs fed RPS had a wider cecal mucosa ($P < 0.05$) and lower middle colonic mucosa ($P < 0.001$) than those in pigs fed CS.

Digestibility of starch in the ileum and cecum (Fig. 4.3.) was lower in pigs fed RPS than in those fed CS ($P < 0.0001$). However, the fractional digestibility of starch in the pigs fed RPS increased from ileum to rectum, in which most starch is extensively fermented in the cecum and proximal colon compartment. Starch digestibility in the colon and rectum did not differ between groups.

Figure 4.2. - Purine bases (A) and short-chain fatty acids (SCFA) concentration (B), in the feces of growing pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM, n=6. **Different from CS, $P < 0.01$.

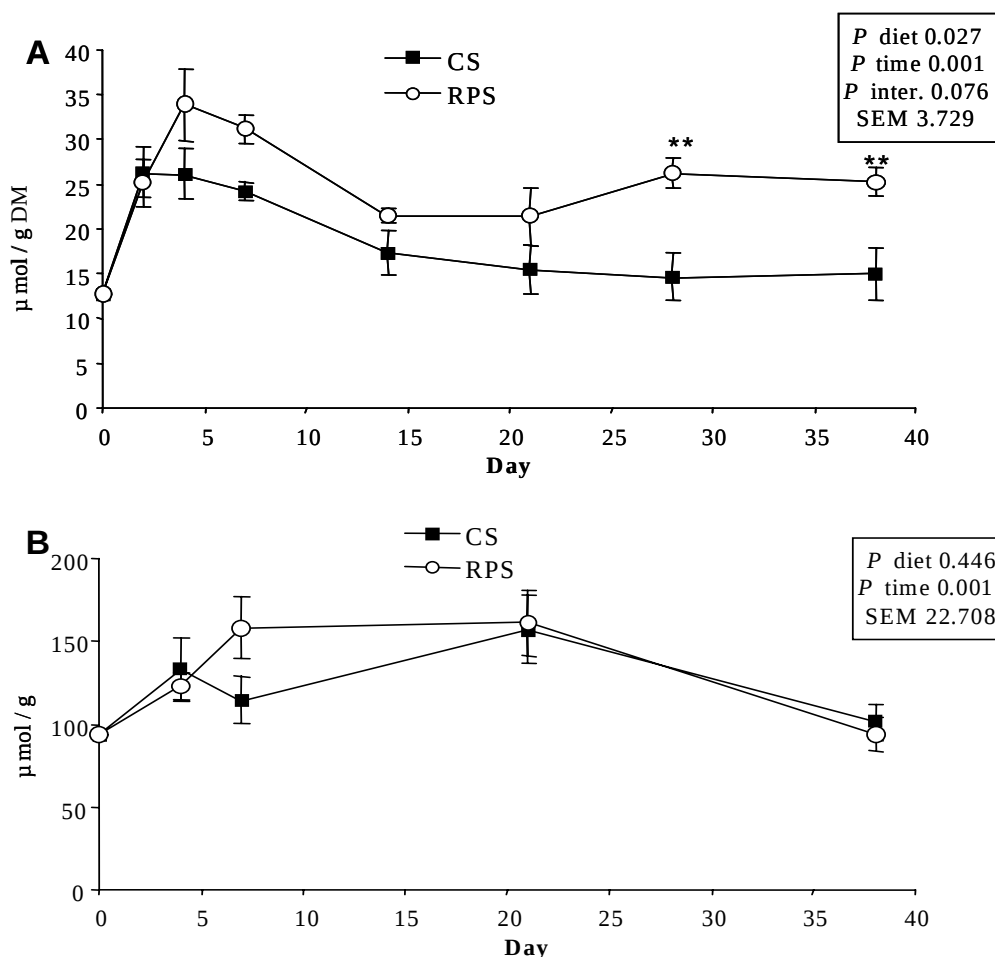


Figure 4.3. - Fractional digestibility of starch in ileal, caecal, middle colonic and rectal digesta of growing pigs fed on diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM, n=6. Means with different letters differ, $P < 0.05$.

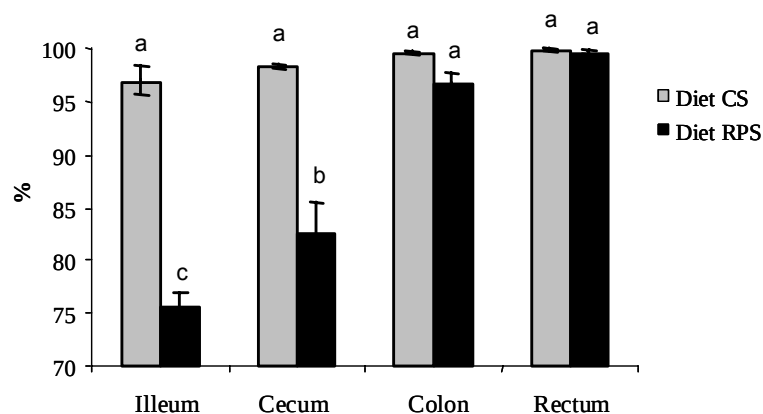


Table 4.3. - The full and empty weights and length of the digestive tract, colonic transit time and the mucosa thickness in cecum and colon of pigs that diets containing 250g/kg of corn starch (Diet CS) or 250g/kg of raw potato starch (Diet RPS)^{1,2}.

	CS	RPS	SEM	Probability
Weight, <i>kg</i>				
Whole tract	7.03	8.11	0.328	0.05
Colon full	2.27	3.26	0.129	0.001
empty	1.04	1.26	0.059	0.05
Length, <i>m</i>				
Small intestine	14.2	13.9	0.47	N.S.
Large bowel	3.4	4.1	0.20	0.05
Transit time, <i>h</i>				
Cecum	2.4	2.0	0.73	N.S.
Colon	16.0	23.0	2.80	N.S.
Mucose thickness, μm				
Cecum	44.8	50.5	1.25	0.05
Colon	45.0	38.6	0.70	0.001

¹ Values are means, n=6.

² Probability; N.S. ($P \geq 0.05$).

Large bowel fermentation is indicated by the PB (Fig. 4.4.A) and SCFA (Fig. 4.4.B) concentrations in digesta. Purine base concentrations increased from ileum to cecum and proximal colon ($P < 0.001$) and decreased from proximal colon to rectum ($P < 0.001$). PB concentration in cecal and proximal colonic digesta did not differ between groups. However, the PB concentrations in the middle colon were higher in pigs fed RPS than CS, and tended to be higher ($P = 0.1$) in the distal colon and rectum. In contrast, the SCFA concentration was elevated only in the proximal colon of pigs fed Diet RPS ($P < 0.01$). The proportion of acetate in the large bowel digesta (mol/mol, Table 4.4) was higher in the middle colon ($P = 0.06$) and rectum ($P < 0.05$) in the CS group than in the RPS group; conversely, the proportion of propionate was lower in the middle colon ($P < 0.05$) and rectum ($P = 0.066$) in the CS group than in the RPS group. Branched-chain SCFA percentages increased through the large bowel in both diet groups ($P < 0.012$) and in the middle colon were higher in the CS group than in the RPS group (0.039 vs. 0.017, $P < 0.05$).

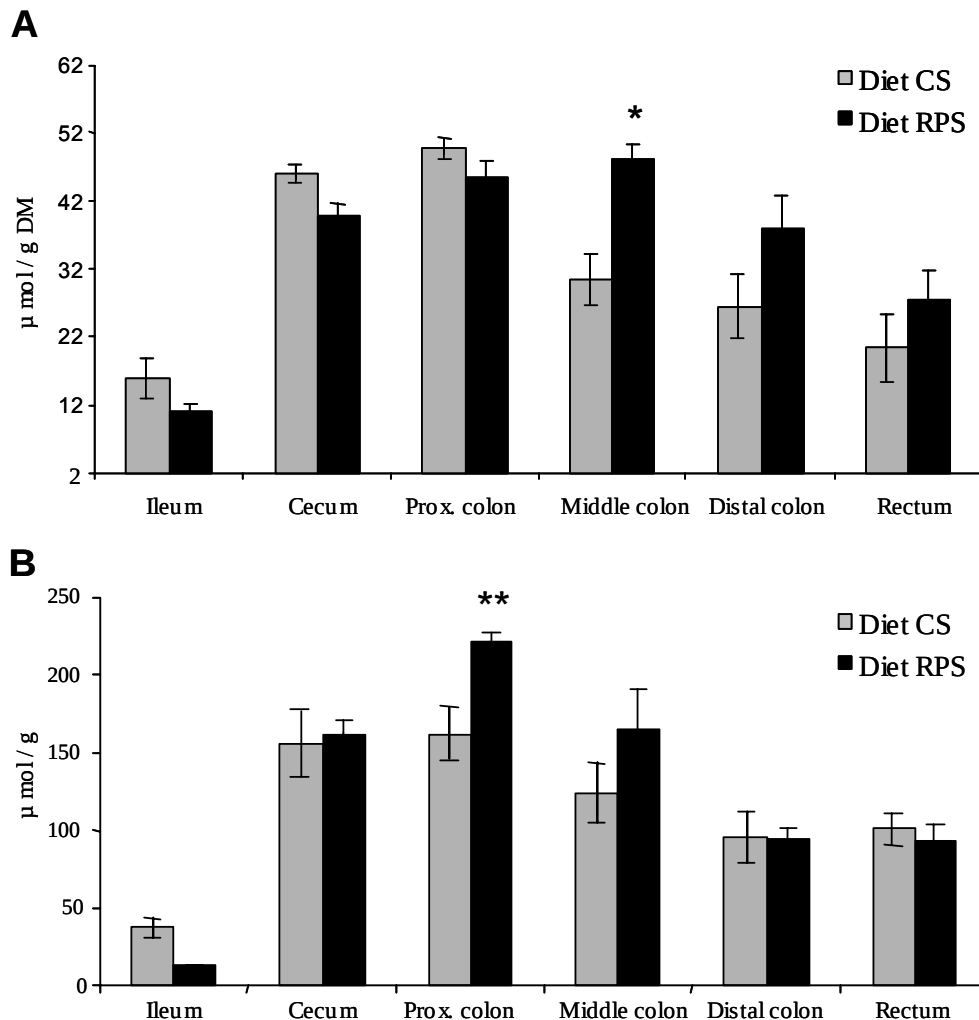
Table 4.4. - SCFA (acetate, propionate, butyrate) and branched-chain short chain fatty acids (BCSCFA) profile in the large bowel digesta of pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (Diet RPS)^{1,2}.

	CS	RPS	SEM	Probability
	<i>mol/mol</i>			
Acetate				
Cecum	0.54	0.52	0.019	N.S.
Middle Colon	0.56	0.48	0.026	N.S.
Rectum	0.59	0.54	0.012	0.05
Propionate				
Cecum	0.30	0.26	0.020	N.S.
Middle Colon	0.22	0.29	0.021	0.05
Rectum	0.21	0.25	0.015	N.S.
Butyrate				
Cecum	0.13	0.18	0.016	N.S.
Middle Colon	0.15	0.18	0.026	N.S.
Rectum	0.12	0.10	0.010	N.S.
BCSCFA				
Cecum	0.001	0.001	0.006	N.S.
Middle Colon	0.04	0.02	0.005	0.05
Rectum	0.06	0.07	0.61	N.S.

¹ Values are means, n=6.

² Probability; N.S. ($P \geq 0.05$).

Figure 4.4. - Purine base (A) and short-chain fatty acid (SCFA) concentration (B), in the large bowel of pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM, n=6. Different from CS, *P < 0.05 and **P < 0.01.



4.4. DISCUSSION

Resistant starch refers to the starch and starch degradation products that resist small intestine digestion and enter the large bowel in normal humans (Asp, 1992). Among the different types of RS, raw potato starch is gelatinized poorly and hydrolyzed slowly by α -amylase. On this basis, we chose RPS and CS to generate a supply of RS to the large bowel of growing pigs.

The addition of RPS increased the amount of starch entering the large bowel and becoming an available source for the colonic microflora. Differences in the ileum digestibility of starch were similar to the values calculated from in vitro analysis (Table 4.1.). However, in vivo digestibility values were higher than estimated in vitro for CS (96.9 vs. 85.0%) and RPS (75.6 vs. 59.3%). In vitro data from recent studies correlate reasonably well with the ileum digestibility of starch when in vitro analysis accounts for physiological variables, including chewing and individual variations in transit (Champ, 1992; Annison & Topping, 1994). Some procedures of amylolysis (Englyst et al, 1992) are preceded by a proteolysis step with pepsin and trypsin to liberate encapsulated starch from the protein matrix. Unfortunately, we did not account for this step in our analytical procedure for resistant starch measurement (Champ, 1992), which could explain the differences between in vivo and in vitro measurements.

A certain amount of starch was resistant over the short-term to whole-tract digestion, which demonstrates a progressive adaptation of growing pigs to the fermentation of starch in the LB. Other investigators have shown that the extent of fermentation of resistant carbohydrates can increase over time in growing pigs (Longland et al, 1993) or rats (Brunsgaard et al, 1995), and justification for a generalized assumption, that fermentation of starch is complete, is not warranted. In fact, on the basis of the total amount of SCFA formed in vitro (Salvador et al, 1993; Casterline et al, 1997), RS fermented more slowly than did whole starch, pectin or β -glucans. It appears that the structure of the resistant starch may limit the penetration of bacteria into the starch granule, which is essential for starch utilization in some bacterial strains (Cotta, 1988). In particular, potato starch takes the form of relatively large spherical or ellipsoidal granules composed of more or less spherical blocklets (400–500 nm in diameter), which, by forming a tough layer at the granule surface, are resistant to enzymic hydrolysis (Gallant et al, 1992).

Theoretically, the increases in LB digestion of carbohydrates may depend on the metabolic activity of LB microflora as they adapt to the substrate (Le Blay et al, 1999) or on marked changes in digesta, including transit time. A certain adaptation of the intestinal flora has been suggested for microorganisms that are efficient in fermenting new cell wall polysaccharides (Tulung et al, 1987) or resistant starch (Le Blay et al, 1999; Brown et al, 1997) entering the LB. The hypothesis is that adaptation to RS results from a progressive selection of particular bacteria populations, most likely starch-fermenting bacteria, such as *Clostridium* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp. or *Butyrivibrio* sp. (Le Blay et al, 1999; Topping & Clifton, 2001). Little is known

about the contribution of other microorganisms, such as protozoa or fungi. From studies with ruminants, it is known that yeast stimulates growth of cellulolytic microorganisms. Therefore, including fungicide in the diet of the present study appears to limit our study with regard to evaluating colonic RS fermentation.

For quantitative purposes, purine bases are probably the most widely used, naturally occurring microbial markers for rumen studies (Smith & McAllan, 1970).). In the present experiment, we used PB and SCFA concentration analyses in feces and digesta as indexes of the microbial proliferation or autolysis. Both diets showed a pronounced increase in the PB concentration in feces during the initial period of adaptation and a progressive decrease beginning at d 4. Early changes on PB concentration are likely associated with the dietary change and the pronounced differences between the preexperimental and the experimental diets. Later decreases in PB concentration occurred simultaneously with increases in dietary digestibility and could reflect a decreased expansion of the biomass as the amount of substrate reaching distal compartments during passage of the fecal stream was reduced. The RPS diet promoted a higher excretion of PB in feces (Fig. 4.2. and 4.4.), concomitantly with a higher excretion of N in feces and a lower excretion of urinary N. It may be that RS reduces urea synthesis and excretion (Tetens et al, 1996; van der Meulen et al, 1997), which is its potential role for clinical purposes, such as the management of liver or renal failure. Bacteria inhabiting the colon of single-stomached animals obtain their energy mainly from dietary carbohydrates escaping foregut digestion (Bergman, 1990). As fermentable carbohydrates decrease along the length of the colon, bacteria switch to the degradation of proteinaceous material and autolysis (Gibson & Roberfroid, 1995; Reid & Hillman, 1999).

Purine base concentrations in digesta decreased in CS- and RPS-fed pigs from the proximal segments of the colon to rectum, although more distal decreases occurred in pigs fed RPS. Moreover, branched-chain SCFA, which are derived from the deamination of amino acids, progressively increased along the large bowel. The response was evident in the proximal segments of the colon of CS-fed pigs and in distal segments of RPS-fed pigs. Given the involvement of proteolytic bacteria in numerous colonic and rectal pathologies (Topping & Clifton, 2001)) in humans, the potential role of RPS in the dissemination of bacteria in the colon and the associated risk of disease should be evaluated.

In contrast, SCFA concentration responses were less pronounced than PB concentration responses in fecal excretion and LB digesta after RPS intake. SCFA are readily absorbed in the large bowel in a concentration-dependent manner, which could explain the similarities in digesta of CS-fed and RPS-fed pigs, and the observation that neither total SCFA nor the individual acids in the distal colon or feces are predictive of the whole fermentation or the SCFA contents in proximal segments (Bach Knudsen et al, 1991; Topping et al, 1993; Bird et al, 2000).

Adaptation to increased consumption of RPS resulted in a marked hypertrophy of the colon (Table 4.3.), as measured by the weight and length, and a similar prolongation of the transit time of digesta in the colon. Other authors have reported that the transit time of digesta in the large bowel was prolonged after increased RPS intake in rats (Mathers et al, 1997; Calvert et al, 1989) and swine (Topping et al 1997). This appears to be an adaptive response aimed at salvaging energy from fermentation.

We were not able to determine the precise contribution of the adaptation of microflora or digestive tract to the time-dependent changes in digestibility after supplying supplementary amounts of RS to growing pigs. The differences in weight of digesta in the colon suggest a physical adaptation of the digestive tract to the extent of RS digestion. However, the variations in the microflora mass and SCFA through the large bowel may suggest a pronounced effect of RS on the proliferation of nonproteolytic bacteria, which deserves a more detailed study. RPS provides a large amount of RS available for LB fermentation. However, the full adaptation of growing pigs to supplementary amounts of RPS requires a period of several weeks to reach complete degradation.

4.5. REFERENCES

- Annison G & Topping DL (1994) Nutritional role of resistant starch chemical structure versus physiological function. *Annu Rev Nutr*, 14: 297-320.
- AOAC (1995) Official Methods of Analysis (16th Ed). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Asp NG (1992) Resistant starch. *EurJClin Nutr* 46: 51.
- Bach Knudsen KE, Borg Jensen B, Andersen JO & Inge Hansen (1991) Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract. *Br J Nutr*, 65: 233-248.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*, 70: 567-590.
- Berry CS (1986) Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *J Cereal Sci*, 4: 301-314.
- Bird AR, Hayawaka T, Marsono Y, Gooden JM, Record IA, Correll RL & Topping DL (2000) Coarse brown rice increase fecal and large bowel short-chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. *J Nutr*, 130: 1780-1787.
- Brown IL, Warhurst M, Arcot J, Playne M, Illman RJ & Topping DL (1997) Fecal numbers of bifidobacteria are high in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose (amylomaize) starch than with a low amylomaize starch. *J Nutr*, 127: 1822-1827.
- Brunsgaard G, Bach-Knudsen KE & Eggum BO (1995) The influence of the period of adaptation on the digestibility of diets containing different types of indigestible polysaccharides in rats. *Br J Nutr* 74: 833-848.
- Calvert RJ, Otsuda M & Satchithanandam S (1989) Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. *J Nutr*, 119: 1610-1616.

- Canadian Council on Animal Care (1993) Guide to the Care and Use of Experimental Animals, vols. 1 & 2.
- Casterline JL, Oles CJ & Ku Y (1997) In vitro fermentation of various food fiber fractions. *J Agric Food Chem*, 45: 2463-2467.
- Champ M (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr*, 46: 551-562.
- Cotta MA (1988) Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 54: 772-776.
- Englyst HN, Kingman SM & Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr*, 46(52): 533-550.
- Faulks RM, Southon S & Livesey G (1989) Utilization of alpha-amylase (EC 3.2.1.1.)-resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. *Br J Nutr*, 61, 291-300.
- Gallant DJ, Bouchet B, Buleon A & Perez S (1992) Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur J Clin Nutr*, 46: S3-S16.
- Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125: 1401-1412.
- Goodlad JS & Mathers JC (1987) Digesta flow from the ileum and transit time through the cecum of rats given diets containing graded levels of peas. *Proc Nutr Soc*, 46: 149A.
- Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR & Muir JG (1999) Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut*, 45: 840-847.
- Heijnen MLA & Beynen AC (1997) Consumption of retrograded (RS3) but not uncooked (RS2) resistant starch shifts nitrogen excretion from urine to feces in cannulated piglets. *J Nutr*, 127: 1828-1832.

- Higgins JA, Brand Miller JC & Denyer GS (1996) Development of insulin resistance in the rat is dependent on the rate of glucose absorption from the diet. *J Nutr*, 126: 596-602.
- Jouany JP (1982) Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des Aliments*, 2: 131-144.
- Kirchgessner M, Kreuzer M, Machmüller A & Roth-Maier DA (1994) Evidence for a high efficiency of bacterial protein synthesis in the digestive tract of adult sows fed supplements of fibrous feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol*, 46: 293-306.
- Le Blay G, Michel C, Blottière HM & Cherbut C (1999) Enhancement of butyrate production in the rat caecolon tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr*, 82: 419-426.
- Longland AC, Low AG, Quelch DB & Bray SP (1993) Adaptation to the digestion of non-starch polysaccharides in growing pigs fed on cereal or semi-purified basal diets. *Br J Nutr*, 70: 557-566.
- Makkar HPS & Becker K (1999) Purine determination in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Br J Nutr* 81: 107-112.
- Mathers JC, Smith H & Carter S (1997) Dose-response effects of raw potato starch on small-intestinal escape, large bowel fermentation and gut transit time in the rat. *Br J Nutr*, 78: 1015-1029.
- National Research Council (1998) Nutrient requirements of swine. 10th edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- Ramakrishna BS, Venkatraman S, Srinivasa P, Dash P, Young GP & Binder HJ (2000) Amylase-resistant starch plus oral rehydration solution for cholera. *New Engl J Med*, 342: 308-313.
- Reid CA & Hillman K (1999) The effects of retrogradation and amylose/amylopectin ratio of starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon. *Anim Sci*, 68: 503-510.

- Salvador V, Cherbut C, Barry JL, Bertrand D, Bonnet C & Delort-Laval J (1993) Sugar composition of dietary fibre and short-chain fatty acid production during *in vitro* fermentation by human bacteria. *Br J Nutr*, 70: 189-197.
- SAS Institute (1996) SAS. SAS Institute. Inc Cary, NC.
- Smith RH & McAllan AB (1970) Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. *Br J Nutr*, 32: 529-537.
- Tetens I, Livesey G & Eggum BO (1996) Effects of the type and level of dietary fibre supplements on nitrogen retention and excretion patterns. *Br J Nutr*, 75: 461-469.
- Theander O (1991) Chemical analysis of lignocellulosic materials. *Anim Feed Sci Technol*, 32: 35-44.
- Topping DL & Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*, 81: 1031-1064.
- Topping DL, Illman RJ, Clarke JM, Trimble RP, Jackson KA & Marsono Y (1993) Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs. *J Nutr*, 123: 133-143.
- Topping DL, Gooden JM, Brown IL, Bierbrick DA, McGrath L, Trimble RP, Choct M & Illman RJ (1997) A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *J Nutr* 127: 615-622.
- Tulung B, Révész C & Demigné C (1987) Specific effects of guar gum or gum arabic on adaptation of cecal digestion to high fiber diets in the rat. *J Nutr* 117: 1556-1561.
- Van der Meulen J, Bakker GCM, Bakker JGM, de Visser H, Jongbloed AW & Everts H (1997) Effect of resistant starch on net portal-drained viscera flux of glucose, volatile fatty acids, urea, and ammonia in growing pigs. *J Anim Sci*, 75: 2697-2704.

Williams BA, Verstegen MWA & Tamminga S (2001) Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Res Rev*, 14: 207-227.

Williams CH, David DJ & Lismaa O (1962) The determination of chromic oxid in feces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J Agric Sci*, 59: 381-385.

Younes H, Rémésy C, Behr S & Demigné C (1997) Fermentable carbohydrate exerts a urea lowering effect in normal and nephrectomized rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 273: 6515-6521.

CAPÍTULO 5

Long-term effects of feeding large amounts of resistant starch on the digestive tract: a study in pigs

Journal of the Science of Food and Agriculture (2005) enviado

ABSTRACT

The present study aimed to assess the digestive consequences in pigs of the long-term intake of two starches providing different amounts of resistant starch. Growing pigs were used as animal model and meal-fed for 14 weeks on a diet containing a high amount of either raw potato starch (RPS) or corn starch (CS). Digestive adaptation was chronologically evaluated by measuring OM, CP, NDF and starch digestibility. After 97 days, whole-tract digestibility of OM, CP and NDF was lower for RPS compared to CS fed pigs, whereas no differences were observed in fecal starch digestibility. In contrast, starch digestibility was reduced in the proximal compartments (ileum, caecum and proximal colon) of animals fed the RPS diet. The concentration of short-chain fatty acids (SCFA; $P<0.05$), and purine bases ($P<0.01$) was also higher in distal colon and rectum of animals fed the RPS diet. Changes in bacterial community structure (dendrogram analyses) were evidenced in the rectum. Biodiversity tends to increase more in RPS compared to CS fed animals (34.1 vs 28.8; $P=0.07$). Among SCFA, the proportion of butyrate was 2-fold higher in proximal colon digesta of RPS compared to CS fed pigs (0.20 vs 0.11; $P<0.05$). Increased butyrate formation in the colon reduced the number of apoptosis per crypt in the proximal colonic mucosa (0.38 vs 0.62; $P<0.05$). RPS fermentation reduced indices associated with damage to intestinal epithelial cells, such as crypt cell hyperproliferation and magnesium excretion. Long term ingestion of RPS induces pronounced changes of the digestive tract and their microflora, modifying mineral absorption and colonic morphology for which health benefits are likely to be associated.

5.1. INTRODUCTION

There are well established beneficial effects of the dietary fibre on some major digestive and metabolic diseases in humans. In particular, the fibre hypothesis has led to the expectation of a protective role against chemically induced large bowel tumors (Govers et al, 1999). Epidemiological studies in particular have indicated that cereal consumption may protect against colorectal cancer (Hill, 1997); and a meta analysis of studies across 12 countries worldwide has shown a strong inverse correlation ($r=-0.70$, $P<0.001$) between starch intake and large bowel cancer risk (Cassidy et al, 1994).

In cereal and legume grains, dietary fibre is mainly comprised of non-starch polysaccharides (NSP) and resistant starches, either slowly and partially hydrolyzed by α -amylase or trapped within the food matrices. Most of these carbohydrates are potentially fermentable, and depending on their composition, structure or physicochemical properties, they are subjected to varying degrees of microbial breakdown in transit through the digestive tract (Glistø et al, 1998). Therefore, much attention has been paid to the implication of the dietary fibre fermentation and short-chain fatty acids (SCFA) release on gut function and metabolism. In this respect, butyrate production, as the preferential colonocyte energy source (Darcy-Vrillon & Dueé 1995; Roediger, 1995), is of particular interest since it contributes to the maturation of colonic epithelium (Cherbuy et al, 1995) and to mucosal regeneration in the event of atrophy (Tappenden et al, 1997). In addition, butyrate is known to assist in the maintenance of a normal cell phenotype through a variety of mechanisms (Kruh et al, 1995).

Human large bowel fermentation of resistant starch appears to increase butyrate production (Noakes et al, 1996; Van Munster et al, 1994). This could help to explain the apparent relationship between increased starch consumption and the diminished risk of colorectal cancer suggested by epidemiological studies (Cassidy et al, 1994). However, the experimental evidence of a benefit of starch on colorectal cancer is not so strong. Data obtained from cancer patients in humans are inconclusive due to the absence of information of SCFA concentration in the digestive tract. On the other hand, in rats exposed to carcinogens and different carbohydrates during a discrete time, Thorup et al (1995) and Cassand et al (1997) but not Young et al (1996) observed a reduction in the number of aberrant crypt foci in animals fed a high resistant starch diet. Criticisms of these experiments have referred to the feebleness of the animal models used, such as that derived from the coprophagic behaviour of rats (Topping & Clifton, 2001).

Moreover, it may be important to consider the time required for intestinal microbiota to adapt to a chronic load of a fermentable substrate. Recent data suggest that the colonic microflora may adapt to produce more butyrate if given time and the proper substrate. Le-Blay et al (1999) reported a six-fold increase of butyrate in the caecal and proximal colon and a three-fold increase in the distal colon of rats after 6 months compared to 15 days of feeding raw potato starch.

The present experiment was designed to study the long-term digestive adaptations of growing pigs to a chronic load of resistant starch, offered as a high intake of raw potato starch, using the pig as the experimental model. The pig was chosen as the experimental animal, because in terms of gastrointestinal anatomy, physiology and microflora it is generally accepted to be closer to humans than any other domesticated animal species (Graham & Aman, 1986; Rowan et al, 1984; Miller & Ullrey, 1987). Whole-tract digestibility changes for the OM, protein, starch, and neutral detergent fibre were evaluated throughout the experiment. Long term effects of resistant starch on the hindgut were also evaluated from the microflora ecology and fermentation (carbohydrates disappearance and SCFA concentration) as well as the gastrointestinal function and morphology.

5.2. MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed at the Experimental Unit of the Universitat Autònoma de Barcelona and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution and conformed with current European Union Regulations on Animal Care for the care and use of animals for research. Purified starches (native corn starch [CS]: 260 g kg⁻¹ amylose, 740 g kg⁻¹ amylopectin; and raw potato starch [RPS]: 200 g kg⁻¹ amylose, 800 g kg⁻¹ amylopectin) were purchased from Cerestar Iberica (Barcelona, Spain). As determined by enzymic analysis (Champ, 1992), CS contained 187 g kg⁻¹ of resistant starch and RPS 637 g kg⁻¹.

5.2.1. Animals and diets

Sixteen Landrace x Large White growing pigs (20.69 kg SD 2.1) were purchased from La Balcona (Vic, Spain). On arrival, they were housed individually on slat bedding, randomly divided into two groups and offered two experimental ground diets, containing either 250 g kg⁻¹ of CS or 250 g kg⁻¹ of RPS. Diets were formulated (Table 5.1., growing diet) according to nutrient requirements of NRC (1998), that is, 13 972 kJ ME/kg, 165.4 g CP kg⁻¹, 10.8 g lysine kg⁻¹, assuming a starch energy content of 16 720

kJ ME kg⁻¹. When animals reached an average body weight of 61.2 (SD 4.47), diets were adapted to the nutrient requirements of the animals (finishing diet: 13 972 kJ ME/kg, 146.7 g CP kg⁻¹, 9.5 g lysine kg⁻¹) and the amount of purified starch increased to 350 g kg⁻¹ of CS or 350 g kg⁻¹ of RPS of feed. Diets were offered ad libitum throughout the experimental period, which consisted of 8 weeks consuming the growing diet and 6 weeks consuming the finishing diet. Cr₂O₃ was included in both diets (1.5 g kg⁻¹) as an indigestible marker.

Table 5.1. - Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets offered to pigs between 21 and 61 kg BW (Growing)) and between 61 and 94 kg BW (Finishing)¹.

Diet	Growing		Finishing	
	CS	RPS	CS	RPS
Ingredients (g kg ⁻¹)				
Corn starch	250	-	350	-
Raw potato starch	-	250	-	350
Ground barley	451	451	389	389
Soybean meal	199	199	215	215
Soybean extruded	66	66	14	14
Dicalcium phosphate	15	15	10	10
Calcium carbonate	6.7	6.7	9.8	9.8
Salt	5	5	5	5
L-Lysine	2	2	1.8	1.8
DL-Methionine	1.2	1.2	1.2	1.2
L-Threonine	0.9	0.9	1	1
Premix ²	2	2	2	2
Cr ₂ O ₃ ³	1.5	1.5	1.5	1.5
Nutrient analysis (g kg ⁻¹ DM)				
Crude protein	167.8	165.1	148.9	144.1
Ash	78.2	70.4	62.1	63.8
Starch	447.0	453.8	572.4	589.7
NDF	222.3	219.0	194.0	191.2

¹150 mg of Etoquin® as antioxidant and 500 mg de Luctamold® as fungicide per kg of feed were added to both diets.

²Premix provided the following per kg of diet: CaCO₃ 12.3g, CaHPO₄ 9g, NaCl 2g, vitamin A, 2,100 µg; vitamin D₃, 45 µg; tocopherol, 10 mg; vitamin K₃, 1 mg; thiamin, 1 mg; riboflavin, 4 mg; pyridoxine, 2 mg; cyanocobalamin, 20 µg; biotin, 10 µg; niacin, 18 mg; Ca-d-pantothenic acid, 10 mg; choline, 175 mg. Minerals: Fe, 80 mg; Zn, 110 mg; Cu, 90 mg; Mn, 50 mg; Co, 0.1 mg; I, 1 mg; Se, 0.2 mg. ³ Analytical (Carlo Erba®, Milan, Italy).

5.2.2. Experimental procedures

On days 11 and 45, at least two faecal samples were collected from each animal for digestibility estimations based on the marker ratio. Briefly, the pens were thoroughly cleaned early in the morning and, over the next 3h, at least two samples of faeces were taken and pooled. Faeces were dried at 60°C, ground (1 mm screen) and stored at room temperature for chemical analysis. On day 97, pigs were killed by an intravenous Na-thiobarbital injection (200 mg kg⁻¹ LW). Immediately, the abdomen was opened and the whole gut excised and ligated to separate and weigh the different compartments: ileum, cecum, proximal-, medial-, distal-colon and rectum. Ileal digesta was sampled from a 300 mm length segment approximately 100 mm anterior to the ileal-caecal junction. Digesta from proximal-, distal-colon and rectum were sampled, pH registered, and the samples stored for analysis of SCFA. An amount of approximately 1g was acidified with 1ml solution containing 50 g L⁻¹ H₃PO₄, 10 g L⁻¹ of mercuric chloride and 50 mmol L⁻¹ of 3-methyl valerate as internal standard, and stored at -20°C until analysis for SCFA concentration. Samples of caecum and rectum were lyophilized for absolute quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli and for phylogenetic identification. Samples of ileum and large bowel digesta were freeze dried and milled for analysis of starch, neutral detergent fibre (NDF), PB and minerals (Ca, P, Mg, Na, K and Cr). Digestibility of the whole-tract and at different intestinal compartments was calculated by the marker (Cr₂O₃) ratio method. A portion of approximately 20 mm in length of proximal colon was fixed by immersion in 100 g L⁻¹ phosphate-buffered formalin for morphometric measurements. Finally, empty caecum and colon were weighed, and small intestine and colon length measured.

5.2.3. Analytical procedures

Chemical analysis of the diets and digesta were performed following the methods of the AOAC (1995) for dry matter, ash, crude protein and fat. NDF contents were determined in the diet and in caecal, colonic and rectal digesta by the procedures of Goering and Van Soest (1970). Starch content in feed and digesta samples were measured by the method of Theander (1991). Starch was determined colorimetrically as glucose released after an enzymatic incubation with thermostable α -amylase (Sigma ref. A-4551) for 1h at 100°C, and the amyloglucosidase (Sigma ref. A-3514) for 4 h at 60°C. Chromium III oxide concentration in feed and digesta was determined by atomic absorption spectrophotometry following the method of Williams et al (1962). Sodium and potassium excreted in faeces was used as an index of water excretion. Sodium, potassium, calcium and magnesium were extracted from rectum and

caecum digesta with HNO₃ and analyzed by atomic emission spectrophotometry (ICP-OES, Perkin-Elmer, Optima 4300DV).

The short-chain fatty acid concentration in deproteinized digesta was determined by GLC, following the method proposed by Jouany (1982). Purine bases (adenine + guanine) in digesta samples (40 mg) were determined by HPLC (Makkar & Becker, 1999) after their acid hydrolysis with 2 mL of 2 mol L⁻¹ perchloric acid at 100°C for 1h. For phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells, DNA from digesta lyophilized digesta of rectum and caecum (50 mg) was extracted and purified using the commercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, West Sussex, UK). Recommended lysis temperature was increased to 90 °C and lysozyme was added after incubation in order to achieve an effective bacterial cell rupture (10 mg mL⁻¹, 37 °C, 30 min). DNA from pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* (CECT 903NT) and *Escherichia coli* (CECT 515NT) was harvested from the bacterial pellet obtained by centrifugation of 6 ml of culture (13000 x g, 2 min) using the same Qiagen Kit. Terminal-Restriction Fragment Length Polymorfism (t-RFLP) analysis of bacteria community was performed following the procedure described by Hojberg et al (2005). A fragment of the 16S rDNA gene (1,497 bp) was amplified using a set of universal primers: S-D-Bact-0008-a-S-20 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(forward)) and reverse PH1552 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Primer S-D-Bact-0008-a-S-20 was 5' FAM (carboxy-fluorescein-*N*-hydrosysuccinimide ester-dimethyl sulfoxide) labeled. The fluorescently labeled PCR products were purified on QIAquick PCR purification kit columns (Qiagen, West Sussex, UK,) and eluted in a final volume of 30 µl of milli-Q water. After that, the product was submitted to a restriction with Hha I (20,000 U µl⁻¹) (Biolabs Inc. New England, USA). The fluorescently labeled terminal restriction fragments were analyzed by capillary electrophoresis on an automatic sequence analyzer (ABI 3100 Genetic Analyzer, PE Biosystems, Warrington, UK) in Gene-Scan mode. For pairwise comparisons of the profiles, Dyce coefficient was calculated and dendograms constructed using Fingerprinting II (Informatix, Bio-Rad, Ca, USA) software and UPGMA method. Total bacteria, lactobacilli and enterobacteria were quantified using real time PCR following procedures described by Castillo et al (2005). The oligonucleotides used were based on regions of identity within 16S rDNA gene and were adapted from published specific primers or probes using the Primer Express Software (Applied Biosystems, CA, USA). For total bacteria, primers used were: F-tot (forward) 5'GCAGGCCTAACACATGCAAGTC3' (adapted from Marchesi et al, 1998) and R-tot (reverse) 5'CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3' (adapted from Amann et al, 1995). For lactobacilli, primers used were: F-lac

5'GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA3' and R-lac 5'GCATTYCACCGCTACACATG3' (adapted from Walter et al, 2001), and for enterobacteria: F-ent 5'ATGGCTGTCGTCAGCTCGT3' (adapted from Leser et al, 2002) and R-ent 5'CCTACTTCTTTTGCAACCCACTC3' (adapted from Sghir et al, 2000). Amplification and detection of DNA by quantitative real-time PCR were performed with the ABI 7900 HT Sequence Detection System using optical grade 96-well plates and SYBR Green dye (PE Biosystems, Warrington, UK). For absolute quantification, PCR products obtained from the amplification of the whole 16S rDNA of *Escherichia coli* (CECT 515NT) and *Lactobacillus acidophilus* (CECT 903NT) were used to construct the standard curves. The PCR conditions corresponded to those published by Leser et al (2002). The amplified gene from *E. coli* was used for absolute quantification of the total bacteria and enterobacteria and the amplified gene from *L. acidophilus* for quantification of the lactobacilli.

Tissue samples for the morphometric study were dehydrated and embedded in paraffin wax, sectioned at 3 µm and stained with haematoxylin and eosin. Ten crypts depth were measured using an ocular micrometer. Paraffin sections were also placed in silane-coated slides [3-(triethoxysilyl)-propylamine] to perform the cleaved caspase-3 immunohistochemistry (Resendes et al, 2004) to identify cells undergoing apoptosis. Ten entire crypts were evaluated, and the average of absolute positive cells per crypt (AbCasp3+) was used as the experimental unit.

5.2.4. Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance according to the general linear model (GLM) procedure of the Statistical Analysis System software package version 6.11 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Repeated measures analysis of variance with time and treatment as the within-subject factor was used to analyse digestibility over time using the model MIXED-type TOEP of SAS, and LSMEANS follow-up test was used for comparisons of means. A two-tailed *P*-value of < 0.05 was considered significant.

5.3. RESULTS

Two incidents were observed during the experiment. One pig fed on the CS diets suffered a rectal prolapse and was sacrificed, and another pig fed on the RPS diet decreased feed intake dramatically during the days previous to sacrifice. Data from these animals was not included in the statistical analysis.

5.3.1. Digestibility measurements

Average whole-tract digestibility of organic matter, crude protein and neutral detergent fibre (NDF) was significantly higher ($P < 0.05$) for CS diet than RPS (Table 5.2.), specially on the short term. No significant differences ($P \geq 0.05$) were observed between diets in the whole-tract digestibility of starch. Values of OM and starch digestibility increased progressively from day 11 to 45, reaching values not different ($P \geq 0.05$) from those obtained at day 97.

Table 5.2. - Whole-tract apparent digestibility of organic matter (OM), crude protein (CP), starch and neutral detergent fibre (NDF) in growing pigs fed diets containing corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS)¹.

(%)	CS	RPS	SEM	Probability
OM				
11	81,7	76,9	1,28	<0,05
45	82,5	80,4	0,9	NS
97	83,4	81,72	1,45	NS
CP				
11	76,2	70,7	1,4	<0,05
45	78,6	72,7	1,47	<0,05
97	78,2	74,7	2,31	NS
Starch				
11	97,8	97,3	0,53	NS
45	98,8	98,5	0,18	NS
97	98,4	98,3	0,21	NS
NDF				
11	65,1	54	2,65	<0,01
45	64,1	61,2	2,41	NS
97	64,5	60	4,61	NS

¹ Values are means, n=7

NS, $P \geq 0.05$.

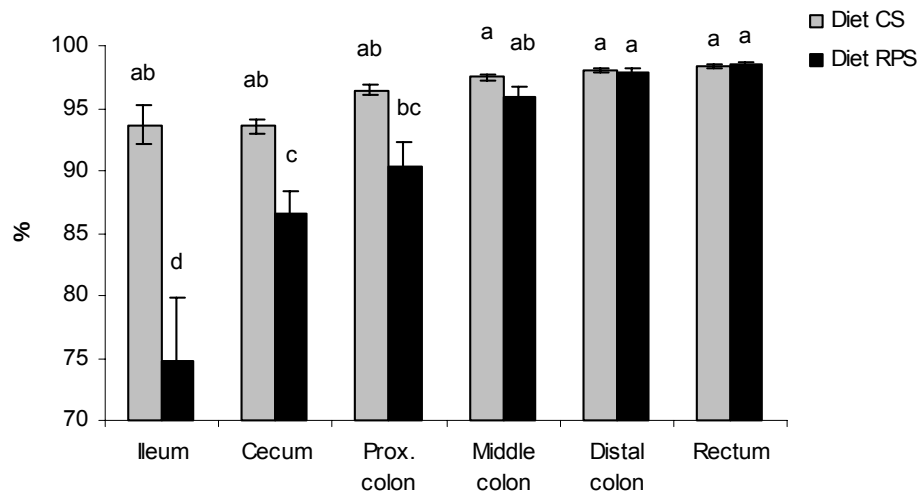
At day 97, digestibility of starch (Figure 5.1.) in the ileum and caecum was lower in RPS pigs than in CS ($P < 0.0001$). However, digestibility of starch in pigs fed diet RPS increased from ileum to rectum. Most starch was extensively fermented in the caecum and proximal colon compartment. In both groups, digestibility of NDF increased from caecum to rectum, specially in the proximal segments with diet CS and more distally with the RPS diet.

Calcium, phosphorus and magnesium digestibilities were measured in the caecum and rectum (Table 5.3.). Although no significant differences ($P \geq 0.05$) were detected in the

caecum, whole-tract digestibility in RPS pigs was reduced (55.1 vs. 44.6; $P < 0.05$) for Ca and increased (15.5 vs. 30.1; $P < 0.05$) for Mg. Increases were also observed in sodium (1.47 vs. 4.06 g/d; $P < 0.05$) and potassium (6.75 vs. 9.96 g/d; $P < 0.05$) fecal excretion, in CS and RPS, respectively.

Figure 5.1. - Digestibility of starch (A) and NDF (B) in ileal, caecal, proximal- middle- and distal-colonic and rectal digesta of growing pigs fed on diets containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM. $n=7$. Means with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

A



B

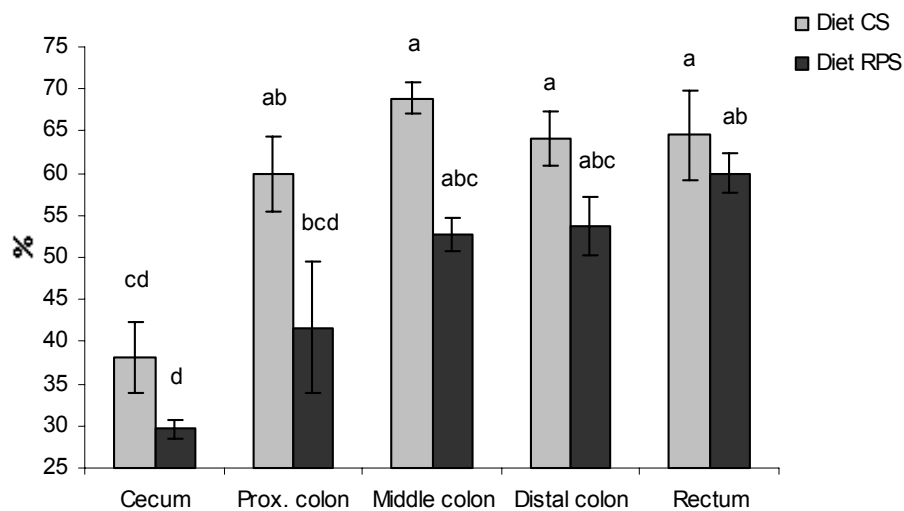


Table 5.3. - Fractional digestibility of calcium, phosphorus and magnesium in caecum and rectum digesta, and daily fecal excretion of sodium and potassium (mg/d) of pigs fed on diets containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS). Values are means $\pm$ SEM. n=7. * Different from CS, $P < 0.05$.

	CS	RPS	SEM	Probability
Caecal digestibility				
Ca	70.40	60.18	3.414	NS
P	64.39	60.36	2.415	NS
Mg	24.61	24.00	4.804	NS
Rectal digestibility				
Ca	55.09	44.63	2.349	<0.05
P	55.22	50.82	2.574	NS
Mg	15.47	30.06	2.824	<0.05
Daily fecal excretion (mg d ⁻¹)				
Na	1.47	4.06	0.639	<0.05
K	6.75	9.96	0.872	<0.05

* Values are means. n=7.

NS, $P \geq 0.05$.

5.3.2. Microflora and fermentation characteristics

Large bowel fermentation was evaluated by the concentration of PB, SCFA (Table 5) and by the phylogenetic identification of microbial cells (Table 4) in the large bowel digesta. A different trend was observed between diets in the PB concentration in digesta from the proximal colon to rectum. It significantly decreased with the animals fed on the CS diet and increased in animals fed the RPS diet. Thus, PB concentration in the rectum digesta was higher ($P < 0.01$) for RPS than CS animals. Significant differences ($P < 0.05$) were also observed between diets in the guanine:adenine ratio, which were significantly higher in the distal colon and rectum for RPS than for CS animals. However, no differences between treatments ($P \geq 0.05$) were observed in total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations analyzed by quantitative-PCR in cecal and rectal compartments (Table 5.4.). Changes in bacterial community structure with the diet were evidenced in the rectum by dendrogram analysis (Figure 5.2.). Biodiversity, measured as number of fragments obtained, tends to increase when using potato starch compared to CS diet (28.5 and 34.1 number of bands for CS and RPS, respectively; $P = 0.07$).

Table 5.4. Concentration ($\mu\text{mol/ g DM}$) of purine bases (PB) and Guanine:Adenine (Gn: Ad) ratio in proximal colon and rectum digesta and enterobacteria and lactobacilli populations ($\log_{10}$ (16S rDNA gene copies / g DM)) in the caecum and rectum of pigs that ingested a diet containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS)*.

	CS	RPS	SEM	Probability
PB ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ DM}$)				
Proximal colon	23.21	21.19	8.142	NS
Distal colon	14.88	29.39	6.013	NS
Rectum	15.24	30.04	3.076	<0.01
Gn: Ad ratio				
Proximal colon	1.33	1.37	0.087	NS
Distal colon	1.20	1.48	0.052	<0.01
Rectum	1.28	1.54	0.039	<0.01
Enterobacteria ($\log_{10}$ (16SrDNA gene copies $\text{g}^{-1}\text{ DM}$))				
Caecum	10.13	10.20	0.448	NS
Rectum	10.28	9.92	0.415	NS
Lactobacilli ($\log_{10}$ (16SrDNA gene copies $\text{g}^{-1}\text{ DM}$))				
Caecum	9.92	9.75	0.465	NS
Rectum	8.64	8.49	0.430	NS

*Values are means. n=7

NS, $P \geq 0.05$

The lowest pH was obtained in the proximal colon, from which a steady increase was observed until rectum digesta. The pH in the proximal colon was higher ($P < 0.01$, Table 5.5.) in pigs fed diet CS, with a 3.3-fold difference in H^+ concentration ($1.12 \mu\text{M}$ vs. $3.7 \mu\text{M}$) existing between diets CS and RPS. Total SCFA ($\mu\text{mol/ g FM}$) concentration decreased from the proximal colon to the rectum, reaching values higher for the RPS (65.32) than the CS (35.84) group ($P < 0.05$). The proportions of acetate (mol/mol, Table 5.5.) in the large bowel digesta was higher in the proximal colon ($P < 0.05$) for the CS group (0.62) than for the RPS group (0.55), while the inverse was observed for the proportion of butyrate (0.11 and 0.20, respectively; $P < 0.05$). Therefore, the concentration of butyrate ($\mu\text{mol/g}$) was higher for RPS than CS in the proximal colon (5.86 vs. 16.30; $P < 0.05$) and medium colon (8.11 vs. 13.70; $P < 0.05$), but no significant differences ($P \geq 0.05$) were observed for the distal colon (4.97 vs. 6.99).

Table 5.5. Total SCFA concentration ($\mu\text{mol/g FM}$) and the proportions (mol/mol) of SCFA (acetate, propionate, butyrate) and branched-chain short chain fatty acids (BCFA) in the large bowel digesta of pigs that ingested a diet containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS)*.

	CS	RPS	SEM	Probability
pH				
Proximal colon	5.95	5.43	0.078	<0.01
Distal colon	6.44	6.32	0.079	NS
Rectum	6.53	6.34	0.080	NS
($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FM}$)				
SCFA				
Proximal colon	88.57	99.82	26.068	NS
Distal colon	62.32	77.37	13.864	NS
Rectum	35.84	65.32	8.615	<0.05
(mol mol ⁻¹)				
Acetate				
Proximal colon	0.62	0.55	0.010	<0.05
Distal colon	0.57	0.57	0.013	NS
Rectum	0.55	0.56	0.011	NS
Propionate				
Proximal colon	0.23	0.19	0.010	NS
Distal colon	0.24	0.25	0.011	NS
Rectum	0.23	0.25	0.010	NS
Butyrate				
Proximal colon	0.11	0.20	0.011	<0.05
Distal colon	0.13	0.11	0.008	<0.05
Rectum	0.13	0.10	0.016	NS
BCFA				
Proximal colon	0.02	0.01	0.003	NS
Distal colon	0.04	0.04	0.006	NS
Rectum	0.06	0.04	0.004	NS

* Values are means. n=7.

NS, $P \geq 0.05$.

Figure 5.2. - Ecological changes in microbial population measured by RFLP. Dendrogram and t-RFLP fragments of the PCR-amplified region of the 16S rDNA. Dendrogram shows the correlation between experimental diets in t-RFLP patterns in samples of the rectum digesta in growing pigs fed on diets containing either corn starch (CS) or raw potato starch (RSP). The dendrogram distances are in percentage of similarity (for more details see materials and methods).

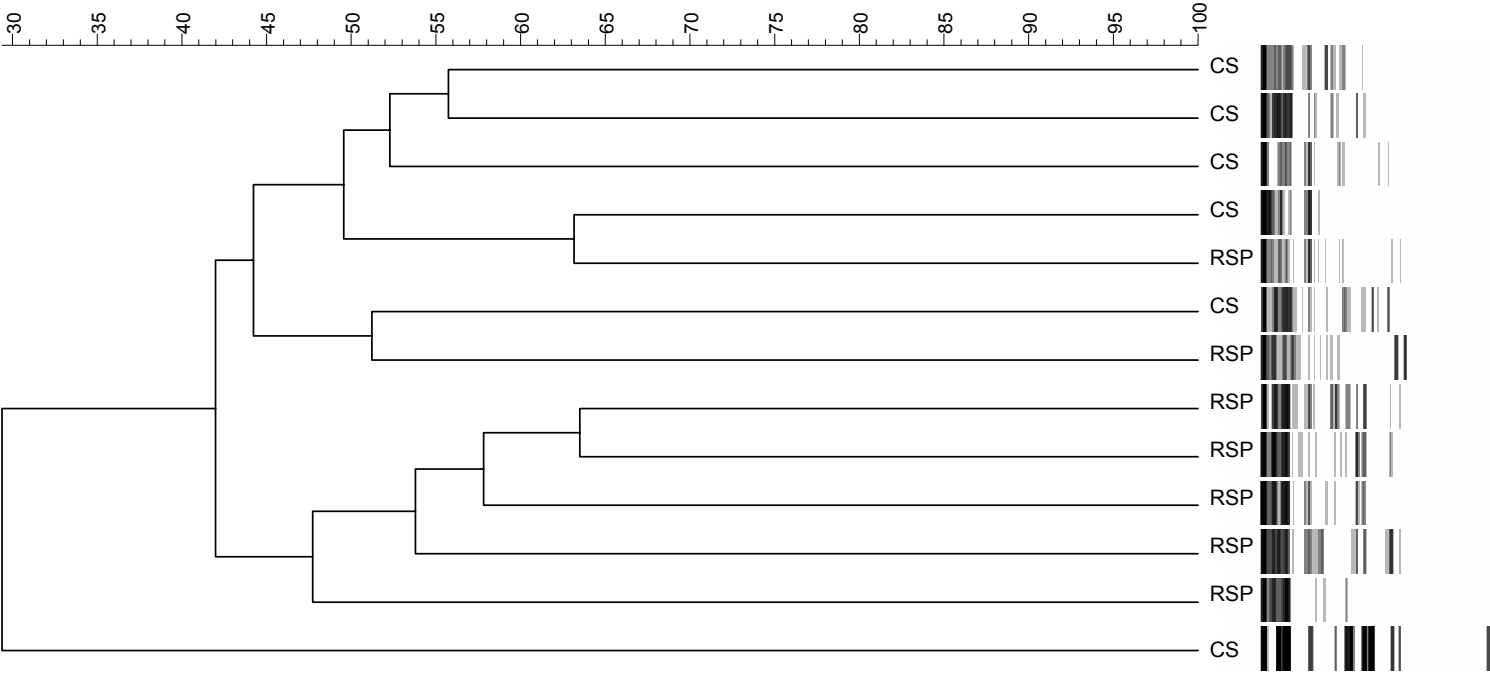


Table 5.6. - Full weight (kg) of the whole digestive tract, full and empty weight of the caecum and colon, length (m) of the small and large bowel and morphometric measurements (crypt depth and number of apoptosis) of pigs that ingested during 97 days a diet containing either corn starch (Diet CS) or raw potato starch (Diet RPS)¹.

	CS	RPS	SEM	Probability
Weight (kg)				
Whole tract full	8.37	10.20	0.557	<0.05
Caecum full	0.55	0.62	0.078	NS
Empty	0.14	0.17	0.015	NS
Colon full	2.65	4.57	0.241	<0.001
Empty	1.13	1.52	0.136	<0.05
Length (m)				
Small intestine	15.7	16.4	0.65	NS
Large bowel	4.0	4.7	0.26	<0.05
Histology				
Crypt depth (μm)	429.8	416.3	4.91	<0.05
Apoptosis (casp3+ cells crypt ⁻¹)	0.62	0.38	0.061	<0.05

¹Values are means. n=7.

NS, $P \geq 0.05$.

5.3.3. Large bowel morphology

The digestive tract (Table 5.6.) from RPS pigs was significantly heavier than for CS pigs ($P<0.05$). Differences were mainly observed in the colon compartment, which in RPS pigs was longer ($P<0.05$) and heavier, whether full ($P<0.001$) or empty ($P<0.05$), than in the CS group. Differences in the colonic compartment were also observed in morphometric measurements. Crypt depth and the number of apoptotic cells per crypt (0.62 vs 0.38; $P<0.05$) in the proximal colon were reduced in RPS pigs.

5.4. DISCUSSION

Starch is a substantial component of the human diet, representing >50% of the daily energy intake in traditional agrarian cultures and as little as 25% in Westernized diets (Baghurst et al, 1996). In the present study we used raw potato starch to evaluate the long term effects of RS fermentation on the concentration and pattern of SCFA in the hindgut of growing pigs, and the associated changes in the colon morphology and

microbiota. The addition of RPS decreased significantly the digestion of starch in the ileum, which represent an increase in the amount of starch entering the large bowel daily (60 and 250 g kg⁻¹ total starch basis, or 86 vs 390 g day⁻¹). In Western countries, it has been estimated that the amount of resistant starch, as a potential substrate for bacteria, may range between 8-40 g d⁻¹, in comparison with the amount of NSP (8-18 g d⁻¹) or oligosaccharides (2-8 g d⁻¹). Of the typical starchy foods, the highest RS concentration is found in the legume grains (95-111 g kg⁻¹ total starch basis; Liljeberg, 2002), green bananas (527 g kg⁻¹; Langkilde et al, 2002) or commercially processed potato products (48-59 g kg⁻¹; Liljeberg, 2002). Among the cereal products, bread of intact rye grains, barley flakes or semolina porridge are identified to have RS levels in the higher range (45-60 g kg⁻¹; Liljeberg, 2002). Slightly lower values are observed in other cereal products (Englyst et al, 2003), such as breakfast cereals (33 g kg⁻¹, - cornflakes, 49 g kg⁻¹), bakery products and crackers (33 g kg⁻¹) and biscuits (32 g kg⁻¹). It is generally accepted that as more starch is eaten, more enters the colon (Chapman et al, 1985), and it is thought that ~10% of dietary starch may escape digestion in the human small intestine (Cassand et al, 1997). In swine production, starch usually represent more than 40% of the commercial diets. Most of these diets are finely ground and pelleted, and the starch contained is easily digested in the small intestine of pigs. However, reductions on the enzymatic digestion of starch by coarse grinding of cereals have been demonstrated in vitro (O'Dea et al, 1980) and in vivo trials (Bach Knudsen and Jørgensen, 2000).

Raw potato starch consumption increased significantly the fecal excretion of OM as evidenced by the change in the whole tract digestibility of OM. The negligible excretion of starch and the increased fecal excretion of protein (Table 2) and PB in the animals fed on the RPS diet (Table 4) support a contribution by RS to fermentation and no a direct fecal bulking effect of starch. In a previous study, we also observed that RPS promoted a higher excretion of PB in feces, concomitantly with a higher excretion of N, mostly from microbial origin (Martinez-Puig et al, 2003). Moreover, RS from raw potato starch showed laxative properties as indicated by the higher excretion of sodium and potassium in the RPS group. It is assumed that these electrolytes are the main cations in feces, and the intestinal contents have an osmolarity of 300 mOsmol L⁻¹, even when diarrhea is present (Fine et al, 1993). It has been reported that RS has mildly laxative properties, equivalent to the less effective forms of NSP, oligosaccharides or inulin (Gibson & Roberfroid, 1995; Mortensen & Nielsen, 1995). In contrast to non-starch polysaccharides (NSP), the mode of action of RS in the colon is fermentation, bacterial growth and SCFA production; while NSP affect colonic function by fermentation and

also through the water-holding capacity of unfermented polysaccharides structures (Adiotomre et al, 1990). An increase in fecal excretion of NDF occurred when RPS was added to the diet. Thus, it is possible that RS exerts a sparing effect on the cell wall fibre in the colon, with bacteria fermenting RS in preference to NSP. Theoretically, the increase in the LB digestion of carbohydrates may depend on the metabolic activity of LB microflora as they adapt to the substrate. In fact, a certain adaptation of the intestinal flora has been suggested for microorganisms that are efficient in fermenting resistant starch (Le Blay et al, 1999), such as *Clostridium* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., or *Butyrivibrio* sp. (Topping & Clifton, 2001; Le Blay et al, 1999). The results obtained with t-RFLP analyses showed that after the administration of RPS, animals achieved a characteristic and homogeneous microbial phylogenetic profile, with a higher number of bands. However, the absence of differences in total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations indicate that, in these animals, both these groups of bacteria were not affected by the administered diet. Diet could have modified the ecology of gastrointestinal microbiota resulting in different patterns of bacteria that are more susceptible to starch (Topping & Clifton, 2001; Le Blay et al, 1999), without modifying the total bacteria inhabiting the upper gastrointestinal tract. In contrast, the PB measurement showed a pronounced increase in the distal segments of RPS animal. It is known that rapidly growing bacteria have several times the quantity of RNA that quiescent cells have. The PB concentration probably reflects a higher active bacterial growth in the intestine of animals fed on RPS.

Changes in the fermentation of carbohydrates promoted changes in the SCFA concentration and pH in digesta. However, increased acidity was not necessarily related to greater SCFA concentration. The effectiveness of using pH of the digesta as an indicator of SCFA concentration is limited because the final pH will depend on the pKa of the SCFA accumulating and on the relative rates of production, absorption and utilization of the acids in the large bowel (Pluske et al, 1998). Consumption of RPS increased significantly the butyrate molar proportion in the proximal colon digesta (0.11 vs 0.20) and slightly decreased in the distal colon and rectum. Fermentation of resistant starch is known to produce high amounts of butyrate (Scheppach et al, 1988; Phillips et al, 1995; Silvester et al, 1995). Thus, compartmental responses of butyrate were in accordance with the fermentation of starch, as the main fractional disappearance of starch was observed in the caecum and proximal colon. It is well known that butyrate, which is the preferred fuel for colonocytes (Roediger, 1995), can inhibit apoptosis of colon crypt cells in vivo (Mentschel & Claus, 2003; Claus et al, 2003). In the present experiment a simultaneous reduction in the crypt depth and the

number of apoptosis per crypt was observed in the RPS group. Crypt depth is considered to be a result of the balance between apoptosis and cell proliferation. Thus, the reduced crypt depth observed in the animals fed on RPS in comparison with CS could suggest that cell proliferation was increased in the CS group. Increases in epithelial proliferation are known to be unspecific responses of damage to epithelial cells (Lapre et al, 1993; Govers et al, 1993). A reduction in cytotoxicity as a result of starch fermentation could be explained by increasing bulking of digesta, suppressing the formation of secondary bile acids (Van Munster et al, 1994) or avoiding protein fermentation which is known to produce toxic end-products such as ammonia (Lin HC and Vissek, 1991). This explanation could be supported by the lower fecal excretion of magnesium observed in pigs fed RPS. Since epithelial cells contain relatively large amounts of magnesium, a reduction in epithelial cell damage due to resistant starch feeding could have reduced the excretion of endogenous sources of Mg in the faeces. In fact, the whole-tract digestibility of magnesium was 2-fold lower than ileal digestibility in CS animals, which indicates a large bowel magnesium secretion. Previous studies of Govers et al (1993) demonstrated the relation between cell damage, colonic hyperproliferation and excretion of endogenous magnesium.

In conclusion, our results indicate that long term ingestion of resistant starch may induce a pronounced adaptation of the digestive tract and microflora to starch fermentation. Specifically, RS fermentation modified microbial phylogenetic profile, increased butyrate production and reduced responses associated to cytotoxic damage of the epithelial cells, for which health benefits are likely to be associated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CICYT funded Project AGL2001-2621-CO2-01.

5.5. REFERENCES

- Adiotomre J, Eastwood MA, Edwards CA & Brydon WG (1990) Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *Am J Clin Nutr* 52, 128-34.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59: 143-169.
- AOAC (1995) Official Methods of Analysis (16th Ed). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Bach Knudsen KE & Jørgensen H (2000) Intestinal degradation of dietary carbohydrates. In *Digestive physiology of pigs*, pp. 109-120 [Lindberg JE and Ogle B, editors]. CABI Publishing, Uppsala, Sweden
- Baghurst PA, Baghurst KI & Record SJ (1996) Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch - a review. *Food Aust* 48, S3-S35.
- Cassand P, Maziere S, Champ M, Meflah K, Bornet F & Narbonne JF (1997) Effects of resistant starch- and vitamin A-supplemented diets on the promotion of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 27, 53-9.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Roca M, Manzanilla EG, Badiola I, Pérez JF & Gasa J (2005) The response of gastrointestinal microbiota to the use of avilamycin, butyrate and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* in Press.
- Cassidy A, Bingham SA & Cummings JH (1994) Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer* 69, 937-942.
- Claus R, Losel D, Lacorn M, Mentschel J & Schenkel H (2003) Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation. *J Anim Sci* 81, 239-48.

- Champ M (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr* 46, 551-562.
- Chapman RW, Sillery JK, Graham MM & Saunders DR (1985) Absorption of starch by healthy ileostomates: effect of transit time and of carbohydrate load. *Am J Clin Nutr* 41, 1244-8.
- Cherbuy C, Darcy-Vrillon B, Morel MT, Pegorier JP & Duee PH (1995) Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. *Gastroenterology* 109, 1890-1899.
- Darcy-Vrillon B & Dueé PH (1995) Fibre effect on nutrient metabolism in splanchnic and peripheral tissues. In *Dietary Fibre: Mechanisms of Action in Human Physiology and Metabolism*, pp. 83-94 [C Cherbut, JL Barry, D Lairon and M Durand, editors]. Paris: John Libbey Eurotext.
- Englyst KN, Vinoy S, Englyst HN & Lang V (2003) Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *Br J Nutr* 89, 329-340.
- Fine KD, Krejs GJ & Fordtran JS (1993) Diarrhea. In *Gastrointestinal Disease*, pp. 1043-1072 [M H Sleisenger & JS Fordtran, editors]. London: WB Saunders Company.
- Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Glistø LV, Brunsgaard G, Højsgaard S, Sandström B & Bach Knudsen KE (1998) Intestinal degradation in pigs of rye dietary fibre with different structural characteristics. *British Journal of Nutrition* 80, 457-468.
- Goering HK & Van Soest PJ (1970) Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). *Agricultural Handbook* n° 379. Washington, DC: ARS and USDA.

- Govers MJ, Lapre JA, De Vries HT & Van der Meer R (1993) Dietary soybean protein compared with casein damages colonic epithelium and stimulates colonic epithelial proliferation in rats. *J Nutr* 123, 1709-1713.
- Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR & Muir JG (1999) Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut* 45, 840-847.
- Graham, H & Aman P (1986) The pig as a model in dietary fiber digestion studies. *Scand J Gastroenterol* 22: 55-61.
- Hill MJ (1997) Cereals, cereal fibre and colorectal cancer risk: a review of the epidemiological literature. *Eur J Cancer Prev* 6, 219-225.
- Højberg O, Canibe N, Poulsen HD, Hedemann MS & Jensen BB (2005) Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl Environ Microbiol* 71:2267-77.
- Jouany JP (1982) Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des Aliments* 2, 131-144.
- Kruh J, Defer N & Tichonky L (1995) Effects of butyrate on cell proliferation and gene expression, in *Physiological and Clinical aspects of Short-Chain Fatty Acids*, Ed by Cummings JH, Rombeau JL and Sakata T. Cambridge Univ Press, Cambridge, pp 275-288.
- Langkilde AM, Champ M & Andersson H (2002) Effects of high-resistant-starch banana flour (RS(2)) on in vitro fermentation and the small-bowel excretion of energy, nutrients, and sterols: an ileostomy study. *Am J Clin Nutr* 75, 104-111.
- Lapre JA, De Vries HT, Koeman JH & Van der Meer R (1993) The antiproliferative effect of dietary calcium on colonic epithelium is mediated by luminal surfactants and dependent on the type of dietary fat. *Cancer Res* 53, 784-789.

- Le Blay G, Michel C, Blottière HM & Cherbut C (1999) Enhancement of butyrate production in the rat caecolon tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* 82, 419-426.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M & M ller K (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68, 673-690.
- Liljeberg EH (2002) Resistant starch content in a selection of starchy foods on the Swedish market. *Eur J Clin Nutr* 56, 500-5.
- Lin HC & Visek WJ (1991) Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J Nutr* 121, 887-893.
- Makkar HPS & Becker K (1999) Purine determination in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Br J Nutr* 81, 107-112.
- Marchesi JT, Sato AJ, Weightman TA, Martin JC, Fry SJ, Hiom D, Dymock D & Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 795-799.
- Martinez-Puig D, Perez JF, Castillo M, Andaluz A, Anguita A, Morales J & Gasa J (2003) Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *J Nutr* 133, 134-139.
- Mentschel J & Claus R (2003) Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism*. 52, 1400-1405.
- Miller ER & Ullrey DE (1987) The pig as a model for human nutrition. *Ann Rev Nutr* 7: 361-382.
- Mortensen FV & Nielsen H (1995) In vivo and in vitro effects of short-chain fatty acids on intestinal blood circulation. In *Physiological and Clinical aspects of Short-Chain Fatty Acids*, p.391 [JH Cummings, JL Rombeau and T Sakata, editors]. Cambridge: Cambridge Univ Press.

- National Research Council (1998) Nutrient requirements of swine. 10th edition. Washington, DC: National Academy Press.
- Noakes M, Clifton PM, Nestel PJ, Le Leu R & McIntosh G (1996) Effect of high-amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 64: 944-951.
- O'Dea K, Nestel PJ & Antonoff L (1980) Physical factors influencing postprandial glucose and insulin responses to starch. *Am J Clin Nutr* 33: 760-765.
- Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K & Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* 62, 121-130.
- Pluske JR, Durmic Z, Pethick DW, Mullan BP & Hampson DJ (1998) Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *J Nutr* 128, 1737-1744.
- Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M & Domingo M (2004) Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 99, 203-213.
- Roediger WEW (1995) The place of short-chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis: the impaired colonocyte barrier. In *Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids*, pp.337-351 [JH Cummings, JL Rombeau and T Sakata, editors]. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K & Tasman-Jones C (1994) Comparison of the ileal and fecal digestibility of dietary amino acids in adult humans evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr* 71: 29-42.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P & Dore (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2263-2266.

- Silvester KR, Englyst HN & Cummings JH (1995) Ileal recovery of starch from whole diets containing resistant starch measured in vitro and fermentation of ileal effluent. *Am J Clin Nutr* 62, 403-411.
- Scheppach W, Fabian C, Sachs M & Kasper H (1988) The effect of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acid excretion in man. *Scand J Gastroenterol* 23, 755-759.
- Tappenden KA, Thomson AB, Wild GE & McBurney MI (1997) Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats. *Gastroenterology* 112, 792-802.
- Theander O (1991) Chemical analysis of lignocellulosic materials. *Anim Feed Sci Technol* 32, 35-44.
- Thorup I, Meyer O & Kristiansen E (1995) Effect of potato starch, cornstarch and sucrose on aberrant crypt foci in rats exposed to azoxymethane. *Anticancer Res* 15, 2101-2105.
- Topping DL & Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064.
- van Munster IP, Tangerman A & Nagengast FM (1994) Effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism, and mucosal proliferation. *Dig Dis Sci* 39, 834-842.
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K & Hammes WP (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2578-2585.
- Williams CH, David DJ & Lismaa O (1962) The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J Agric Sci* 59, 381-385.

Young GP, McIntyre A, Albert V, Folino M, Muir JG & Gibson PR (1996) Wheat bran suppresses potato starch--potentiated colorectal tumorigenesis at the aberrant crypt stage in a rat model. *Gastroenterology* 110, 508-514.

CAPÍTULO 6

**Consumption of Resistant Starch Decreases Lipogenesis in Adipose Tissues but
not in Muscular Tissues of Growing Pigs**

Livestock Science (2006) 99: 237-247

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of two different sources of starch on the plasma glucose, acetate and insulin responses and peripheral lipogenesis in adipose and skeletal muscle tissues. Eighteen male growing pigs were fed during 38 days, a diet containing 250 g/kg native corn starch (CS; 26% amylose, 74% amylopectin) or 250 g/kg raw potato starch (RPS) as examples of digestible and resistant starch (type II), respectively. In experiment 1, twelve pigs were euthanized and adipose and muscular tissues were sampled for intramuscular lipid content and lipogenic enzymes activities analyses. Lipogenic enzymes activities were significantly higher for CS than RPS in adipose tissues but not in muscular tissues. No differences were also detected on the lipid content of the muscles tested. In experiment 2, six growing pigs received a primed constant infusion of 1-¹³C acetate during 90 min 5 h after feeding, and a primed constant infusion of 6,6-D² glucose during 7 h from 1 h before the meal ingestion. No differences were observed between diets on peripheral acetate entry rate. Glucose concentration, the rate of peripheral glucose appearance and insulin concentration were quantitatively higher after the meal for CS than RPS diet. These data demonstrate a major influence of dietary type of starch on lipogenesis as a result of changes in glycemia and insulinemia in adipose but not in muscular tissues of growing pigs.

6.1. INTRODUCTION

Skeletal muscle triglyceride levels are considered of remarkable interest in pig production as a factor contributing to the organoleptic properties of meat, such as tenderness and flavor (Cannon et al, 1995). Intramuscular lipids in pigs mainly originate from in situ lipogenesis, with little contribution from the liver, in contrast with other species and humans (O’Hea and Leveille, 1969). Numerous studies demonstrate the broad influence of swine genotype on lipogenesis, as reflect the comparison between breeds, Iberian and Landrace pigs (Morales et al, 2002) or Meishan and Large White pigs (Mourot and Kouba 1998). Roughly, it is known that modern genotypes selected for growth rate and feed efficiency show a lower voluntary intake correlated with lower whole body fat and muscle triglycerides content (Karlsson et al, 1993).

However, nutrition and endocrine status are considered main factors contributing to the development of skeletal muscle and lipogenesis. Energy intake is considered to be the major factor conditioning whole body lipogenesis. Thus, feed restriction is able to modify morphological and biochemical characteristics of muscle and adipose tissue in pigs, conducting to a reduction of muscle lipid concentration, as evidenced in the longissimus muscle of pigs slaughtered at the same weight as their well nourished counterparts (Candek-Potokar et al, 1999; Wood, 1990). On the other hand, the macronutrients composition of the diet may also affect the development of adipose tissue and lipogenesis. In particular, many studies in rodents have shown greater stimulation of fatty acid synthesis by high-sugar than by high starch diets (Glinsmann et al, 1986; Shillabeer et al, 1990). The difference is more pronounced with fat-free diets and diminish with a rise in the percentage of energy from fat, which is known to suppress *de novo* lipogenesis (Allee et al, 1972). These changes have been related to differences in glucose flux or insulin metabolism between complex carbohydrates and short chain sugar polymers. Starch may be absorbed more slowly than glucose, with lower postprandial rises in insulin and glucose. Moreover, the bacterial fermentation of resistant starches in the large intestine produces SCFA, which may also exert effects on lipid and insulin metabolism (Nishina and Freedland 1990; Wolever et al, 1995). However, few experiments have studied in swine the digestion of starch as a factor conditioning the peripheral lipogenesis in skeletal muscle and adipose tissues.

In this work, we studied the influence of two different sources of starch, corn starch (CS) and raw potato starch (RPS), on the plasma glucose and insulin responses, and the peripheral acetate entry rate in growing pigs. We also evaluated the long term

dietary effects of type of starch on the lipogenic enzyme activities, malic enzyme (ME), glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH) and acetyl-CoA carboxylase (ACX), and lipid content in adipose tissue and skeletal muscle. A preliminary account of part of the present study has been published (Martinez-Puig et al, 2003).

6.2. MATERIALS AND METHODS

The experiment was performed at the Experimental Unit of the Universitat Autònoma de Barcelona and received prior approval from the Animal Protocol Review Committee of this institution and conformed with current European Union Regulations on Animal Care for the care and use of animals for research. Purified starches (native corn starch, CS, 26% amylose, 74% amylopectin; and raw potato starch, RPS, 20% amylose, 80% amylopectin) were purchased from Cerestar Iberica (Barcelona, Spain). As determined by enzymatic analyses (Champ, 1992), CS contained 187 g/kg of resistant starch and RPS 637 g/kg.

6.2.1. Experiment 1

6.2.1.1. Animals and diets

Twelve Landrace x Large White growing pigs averaging 18.4 ± 1.0 kg (mean $\pm$ SD) live weight (LW) were purchased from La Balcona (Vic, Spain). On arrival, they were housed individually, and administered a pre-experimental ground and solid diet mainly composed of corn, soybean meal and fish meal. With an initial LW of 27.4 ± 1.3 kg, pigs in each location were randomly divided into two groups and offered two experimental ground diets, containing either 250 g/kg of CS or 250 g/kg of RPS. Diets were formulated (Table 6.1.) according to nutrient requirements of NRC (1998), that is, 13,690 kJ ME/kg, 189.4 g CP/kg, 11 g lysine/kg, assuming a starch energy content of 16,720 kJ ME/kg. Diets were presented at a rate of 0.90 of the estimated weekly voluntary intake (NRC, 1998) in two equal meals at 08:00 and 20:00h.

On day 38, from 2 to 3 h after feeding, the twelve remaining pigs were euthanized by an endogenous Na-thiobarbital injection (200 mg/kg LW). Immediately, adipose and muscular tissues were sampled for lipogenic enzyme activity analyses. Adipose tissue samples were taken from subcutaneous backfat near the 15th-16th costal area, intermuscular fat from the hindlimb region (between semitendinous and semimembranous muscles) and abdominal fat from the mesenteric fat depot. Muscle samples were taken from the longissimus dorsi, longissimus thoracis and the gluteus medium muscles. All these samples were immediately frozen in liquid N₂ and stored at

–80°C until analyses of lipogenic activity. Backfat was measured near the 15th-16th costal area. Samples from 3 muscles, longissimus dorsi, longissimus thoracis and gluteus medium, were also taken and freeze-dried for the analyses of intramuscular lipid content.

Table 6.1. - Composition and analyzed nutrient content of the experimental diets¹.

Diet	CS	RPS
Ingredients (g/kg)		
Corn starch	250	---
Raw potato starch	-	250
Ground barley	289	289
Soybean meal	325	325
Wheat mills	80	80
Tallow	21.6	21.6
DL-Methionine	1	1
Premix ²	24.3	24.3
Cr ₂ O ₃ ³	1.5	1.5
Nutrient analysis (g/kg DM)		
Crude protein	212.8	211.7
Crude fat	37.3	37.3
Crude fibre	50.7	49.9
Ash	57.0	59.2
Starch	392	398
Resistant starch	58.7	161.8
PNA [†]	171.1	173.6

¹.150 mg of Etoxiquin® as antioxidant and 500 mg de Luctamold® as fungicide per kg of feed were added to both diets.

².Premix provided the following per kg of diet: CaCO₃ 12.3g, CaHPO₄ 9g, NaCl 2g, vitamin A, 2,100 µg; vitamin D₃, 45 µg; tocopherol, 10 mg; vitamin K₃, 1 mg; thiamin, 1 mg; riboflavin, 4 mg; pyridoxine, 2 mg; cyanocobalamin, 20 µg; biotin, 10 µg; niacin, 18 mg; Ca-d-pantothenic acid, 10 mg; choline, 175 mg. Minerals: Fe, 80 mg; Zn, 110 mg; Cu, 90 mg; Mn, 50 mg; Co, 0.1 mg; I, 1 mg; Se, 0.2 mg.

³. Analytical (Carlo Erba®, Milan, Italy)

6.2.1.2. Analytical procedures

Lipogenic enzyme activities of subcutaneous, abdominal, inter- and intramuscular adipose tissues were determined as follows: weighted quantities of adipose tissue or muscle were homogenised in 0.25 M sucrose buffer and centrifuged at 30,000 x g for 40 min. Supernatants were analysed for ME (EC 1.1.1.40) and G6PDH (EC 1.1.1.49) using a modification (Gandemer et al, 1983) of the methods of Fitch et al (1959) and

Hsu and Lardy (1969), respectively. NADPH formation was measured at 37°C by absorbance at 340 nm. Soluble proteins in adipose tissue supernatants were determined using the bicinchoninic acid protein assay (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, Rockford, IL). The ME and G6PDH activities were expressed in μmol of NADPH produced per min per gram of muscular tissue or per gram of supernatant protein from adipose tissue. Acetyl-CoA-carboxylase (ACX) (EC 6.4.1.2) activity was assayed by the $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ fixation method (Chang et al, 1967; Chakrabarty and Leveille, 1968; 1969). Muscle and adipose tissue lipid content was extracted following the Soxhlet procedure.

6.2.2. Experiment 2

6.2.2.1. Animals and diets

Six Landrace x Large White growing pigs were purchased from the same origin than Experiment 1. The animals averaging 29.0 ± 0.73 kg (mean $\pm$ SD) live weight (LW) were housed individually, and administered the two experimental ground diets (ie. three animals in each diet), containing either 250 g/kg of CS or 250 g/kg of RPS (Experiment 1). In order to avoid the animal variability on the voluntary intake, diets were presented at a rate of 0.90 of the estimated weekly voluntary intake (NRC, 1998) in two equal meals at 08:00 and 20:00h.

After 28 days of eating the experimental diet (average weight of 48.13 ± 1.15 kg), the animals underwent general anesthesia (O_2 , NO_2 , halothane) and were fitted with polyvinyl catheters (1.3mm ID, 2.3mm OD, Braun, Barcelona, Spain) in the saphenous vein and phemoral artery. After surgery the animals were allocated in metabolic cages the experimental diets. A high variability was observed on the voluntary intake among animals and thorough the postsurgery period. Then we decided to fix the amount of feed offered to 1.1 kg/day of the diet in three equal meals at 07:00, 15:00 and 23:00h. After a seven days recovery period, pigs ate the daily offered diet and showed normal stools.

6.2.2.2. Tracer infusions

Tracer infusions were performed on day 8 with animals following the same feeding pattern (07:00, 15:00 and 23:00h ; 1.1 kg/day). $[1-^{13}\text{C}]$ acetate and $[6,6\text{-D}^2]$ glucose (99% enrichment) were purchased from Isomed (Barcelona, Spain). The influents were stored at 4°C for 24h before administration. Between 12:00h and 13:30h PM, the animals received a primed ($70 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) constant rate ($1.94 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 90min) intravenous infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ acetate. Blood samples were obtained at the

beginning exactly of the bolus injector (at 0 min) and thereafter every 15 min up to the end of the infusion. At 14:00h PM, 60 min prior to the meal, the animals received a primed ($8.1 \mu\text{mol/kg LW}$) constant intravenous infusion of $\text{D}^2\text{-glucose}$ at a rate of $0.48 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ since 21:00h PM. Blood samples were obtained from the phtemoral artery at the beginning exactly of the bolus injector and at 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 min after meal consumption for analyses of plasma glucose and insulin concentration, and $\text{D}_2\text{-glucose}$ enrichment. Blood was collected in heparinized tubes (Terumo, Barcelona, Spain) and centrifuged ($9,000 \times g$ for 10 min at 4°C). Plasma was isolated and kept at -80°C until analyses.

6.2.2.3. Analytical procedures and calculations

6.2.2.3.1. *Glucose and acetate analyses*

Plasma glucose concentration was determined enzymatically following the manufacturer's recommendations (Glucoquant; Roche Molecular Biochemicals). The pentaacetate derivative of glucose was prepared as previously described (Sunehag et al, 1996). The (M+2) isotopomers of glucose were analysed by gas-chromatography / mass-spectrofotometry (GCMS; HP 6890/5973 (Palo Alto, CA); GC column DB1, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) using the electron impact mode. The ions monitored were 242, representing unlabeled glucose, 243, and 244 representing fragments derived from [6,6- D_2] glucose. Plasma insulin was analysed using commercially available ELISA kit (Mercodia Insulin ELISA, Uppsala, Sweden).

Plasma acetate enrichment was measured following the published method of Pouteau et al (Pouteau et al, 1998). Briefly, an internal standard (24 μL [D_3]acetate, $2.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added to 500 μL of plasma sample in order to measure plasma acetate concentration. Plasma samples were deproteinized with 20 mg of sulfosalicylic acid (Sigma, St Quentin Fallavier, France) and centrifuged at $2200 \times g$ for 30 min. Three mL of diethylic ether (Flucka Chemika, Bushs, Switzerland) were added into the supernatants for acetate extraction. The samples were vortexed and centrifuged for 15 min at $1200 \times g$ and 8 μL of *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) imidazole (Flucka, Chemika, Bushs, Switzerland) were added to the separated organic phase. The TBDMS-derivatives were heated at 60°C for 30 min, then cooled and evaporated to 500 μL . The (M+1) and (M+3) isotopomers of acetate were analysed by GCMS (HP 5890/5971^a (Palo Alto, CA); GC column DB1, (J/W Scientific, Folsom, CA) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) using electron impact ionisation with an electron energy of 70 eV. In order to measure acetate enrichment and concentration, single ion monitoring was carried out on the fragment ions at m/z 117, 118, 120 corresponding to $M\text{-(C-(CH}_3)_3)$ or ($M\text{-57}$).

Calibration curve for isotopic enrichments was prepared in the range of 0% to 20% for [1-¹³C]acetate. Concentration calibration was obtained from basal to 390 µmol/L of acetate.

6.2.2.3.2. Rate of glucose appearance in the systemic pool

The isotopic abundance of the samples was expressed in M+2 isotopomer % (Mol Percent MP). The MP of infused and plasma glucose was transformed into mol percent excess (MPE) by the following formula: $MPE = MP_s - MP_b$, where MP_s is the MP of the studied sample and MP_b is the MP of the sample obtained immediately before the bolus injection. The rate of glucose appearance ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) was calculated from the M+2 enrichment of plasma glucose according to the equation of Steele (1959) as modified by De Bodo et al (1963) for a non-steady state:

$$Ra = \frac{F \cdot V \cdot p [(G_1 + G_2) / 2] \cdot [(MPE_2 - MPE_1) / (t_2 - t_1)]}{(MPE_2 - MPE_1) / 2}$$

where F is the infusion rate of tracer D₂ glucose ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), MPE_1 and MPE_2 are M+2 % enrichment values of plasma glucose, respectively, at time t_1 and t_2 (min) and G_1 and G_2 (mol) are the plasma glucose concentration, respectively, at times t_1 and t_2 . The distribution volume (V) was assumed to be 0.2 L/kg and a pool fraction value (p) of 0.65 was chosen for the study (Müller et al, 1984).

6.2.2.3.3. Rate of acetate appearance in the systemic pool

During the period after 180 min of acetate infusion, approximate steady state (defined by a CV of < 10% with a slope not different from 0) was achieved for plasma concentration (CV=9.1%) and isotopic enrichment of acetate (CV=6.3%) (steady state measurement period). The rates of total appearance of acetate were calculated according to the equations described in steady-state conditions (Pouteau et al, 1998). Area under the curve (AUC) for a 240 min postprandial period was calculated for each plasma index according to the trapezoidal method.

6.2.3. Statistical analysis

Data of muscle and adipose tissue were subjected to ANOVA according to the general linear model (GLM) procedure of SAS (1996). Repeated measures analyses of variance with time and treatment as the within-subject factor was used to analyse plasma glucose, insulin and glucose rate of appearance using the model MIXED-type TOEP of SAS (1996), and LSMEANS follow-up test was used for comparisons of means. A two-tailed P-value of < 0.05 was considered significant.

6.3. RESULTS

6.3.1. Experiment 1

Lipogenesis in pigs were measured through the measurement of fatty contents in tissues (backfat thickness or lipid content in muscles) and lipogenic enzymes activities as measured *in vitro*. Backfat thickness (Table 6.2.) tended to be greater in pigs fed CS than RPS (10 vs 8.2 mm; $P<0.06$). However, the lipid content in muscles (Table 6.3.) was not significantly different between diets. Lipogenic enzyme activities showed significant differences between diets for adipose but not for muscular tissue. The ACX activity ($\text{nmol HCO}_3^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$) was higher for CS than RPS in abdominal adipose tissue (0.16 vs 0.06 $P<0.05$). Average ACX values ($\text{nmol HCO}_3^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$) were 0.60 for longissimus thoracis, 0.48 for gluteus medium and 0.20 for longissimus dorsi. Malic enzyme (ME; $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$) activity was higher for CS than RPS in subcutaneous adipose tissue (3.88 vs 2.61; $P<0.01$) and abdominal adipose tissue (4.04 vs 1.88 $P<0.05$). Average ME values ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$) were 2.75 for longissimus thoracis, 2.24 for gluteus medium and 1.44 for longissimus dorsi. The G6PDH activity ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$) was higher for CS than RPS in subcutaneous adipose tissue (1.59 vs 0.90, $P<0.01$) and abdominal adipose tissue (1.70 vs 0.87, $P<0.05$), respectively. Average G6PDH values ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$) were 0.36 for longissimus thoracis, 0.22 for gluteus medium and 0.15 for longissimus dorsi.

Table 6.2. - Backfat thickness (mm) and activity of acetyl-CoA carboxylase (ACX), malic enzyme (ME) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) determined in the adipose tissue (subcutaneous, intermuscular and abdominal) of growing pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg raw potato starch (Diet RPS).^{1, 2} (Experiment 1)

	CS	RPS	SE	Probability
Backfat thickness (mm)	100	82	6,169	N.S. (0,06)
ACX (nmol HCO ₃ ⁻ · min ⁻¹ · g ⁻¹ protein)				
Subcutaneous	0,12	0,08	0,026	N.S.
Intermuscular	0,05	0,02	0,013	N.S.
Abdominal	0,16	0,06	0,022	<0,05
ME (μmol NADPH min ⁻¹ g ⁻¹ protein)				
Subcutaneous	3,88	2,61	0,277	<0,01
Intermuscular	1,06	0,77	0,144	N.S.
Abdominal	4,04	1,88	0,548	<0,05
G6PDH μmol NADPH min ⁻¹ g ⁻¹ protein)				
Subcutaneous	1,59	0,90	0,124	<0,01
Intermuscular	0,43	0,34	0,064	N.S.
Abdominal	1,70	0,87	0,241	<0,05

¹ Values are means, n=3.

² Probability; N.S. (P ≥ 0.05).

Table 6.3. - Intramuscular fat content (g/kg DM) and activity of acetyl-CoA carboxylase (ACX), malic enzyme (ME) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) determined in muscle tissues (longissimus thoracis, gluteus medium and longissimus dorsi) of growing pigs fed diets containing 250 g/kg of corn starch (Diet CS) or 250 g/kg raw potato starch (Diet RPS).^{1,2} (Experiment 1)

	CS	RPS	SEM	Probability
Intramuscular fat (g/kg DM)				
Longissimus thoracis	197,95	160,75	27,99	N.S.
Gluteus medium	76,07	57,23	6,73	N.S.
Longissimus dorsi	68,13	67,82	12,54	N.S.
ACX (nmol HCO ₃ ⁻ · min ⁻¹ · g ⁻¹ protein)				
Longissimus thoracis	0,66	0,53	0,090	N.S.
Gluteus medium	0,54	0,42	0,079	N.S.
Longissimus dorsi	0,21	0,19	0,036	N.S.
ME (μmol NADPH min ⁻¹ g ⁻¹ FM)				
Longissimus thoracis	2,73	2,77	0,205	N.S.
Gluteus medium	2,38	2,10	0,210	N.S.
Longissimus dorsi	1,43	1,46	0,205	N.S.
G6PDH (μmol NADPH min ⁻¹ g ⁻¹ FM)				
Longissimus thoracis	0,40	0,32	0,090	N.S.
Gluteus medium	0,28	0,17	0,089	N.S.
Longissimus dorsi	0,14	0,17	0,046	N.S.

¹ Values are means, n=3.

² Probability; N.S. (P ≥ 0.05).

6.3.2. Experiment 2

6.3.2.1. Peripheral glucose responses

Basal arterial plasma glucose concentration was not different between the pigs fed CS (4.82 ± 0.09 mmol/L) and RPS (4.88 ± 0.12 mmol/L). Glucose concentration (Figure 6.1., A) increased immediately after the meal and reached a maximum increment in pigs fed CS (0.769 mmol/L) after 30 min and in pigs fed RPS (0.852 mmol/L) after 15 min. A double peak pattern was observed for both diets, showing an earlier second peak for diet RPS (45 min; 0.51 ± 0.218 mmol/L) than CS (90 min; 0.41 ± 0.353

mmol/L). The AUC of glucose concentration increments (Table 6.4.) was 125 ± 39.3 and $61 \pm 17.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for pigs fed CS and RPS respectively. Rate of peripheral glucose appearance, before the CS and RPS meal, was 61.2 ± 8.44 and $61.9 \pm 12.26 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively ($P > 0.05$). Glucose appearance (Figure 6.1., B) increased immediately after the meal and reached maximum increments after 60 min for animals fed on CS diet ($131 \pm 67.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and RPS diet ($90 \pm 20.9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ($P > 0.05$). From these values glucose appearance decreased progressively and reached values not significant different of basal values at 270 min for CS and 150 min for RPS. As calculated by the AUC, the cumulated amount of glucose appearing at the peripheral level for a postprandial period of 240 min (Table 6.4.) was $21.9 \pm 5.24 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ for CS and $12.9 \pm 2.78 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ for RPS ($P > 0.05$).

Table 6.4. - Area under the curve (AUC) and maximum concentration increments (MCI) of the glucose, rate of glucose appearance and insulin in plasma after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch (diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (diet RPS). ^{1,2} (Experiment 2)

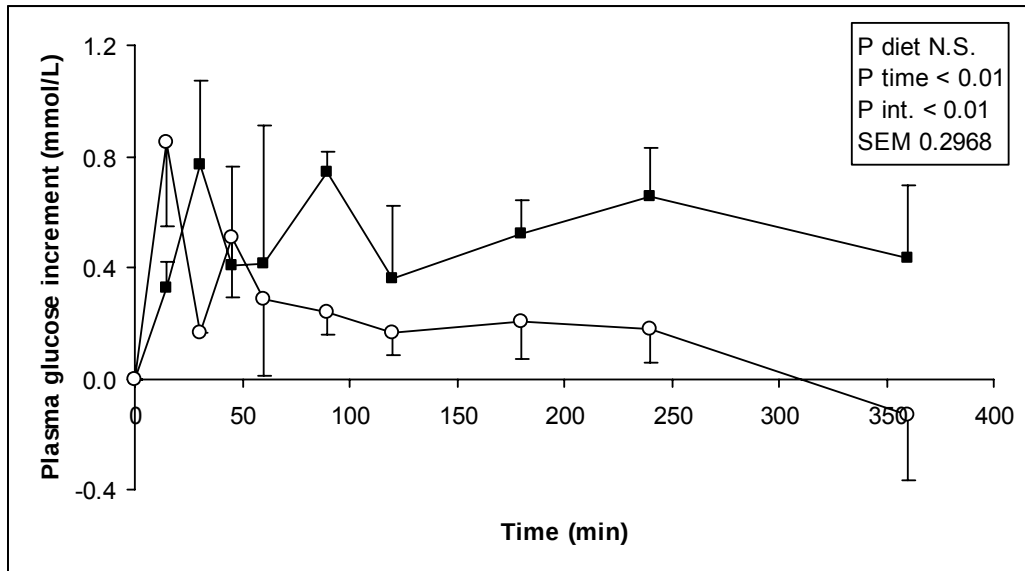
	Glucose		Rate of glucose appearance		Insulin	
	AUC	MCI	AUC	MCI	AUC	MCI
	mmol / L		$\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$		Times basal level	
CS	125.0	0.77	21945	131.7	383.8	4.18
RPS	61.4	0.85	12921	90.1	167.8	3.89
SEM	30.38	0.297	5089.6	34.73	122.81	1.97
Probability	N.S.	N.S.	N.S.	N.S. (0.09)	N.S.	N.S.

¹ Values are means, n=3.

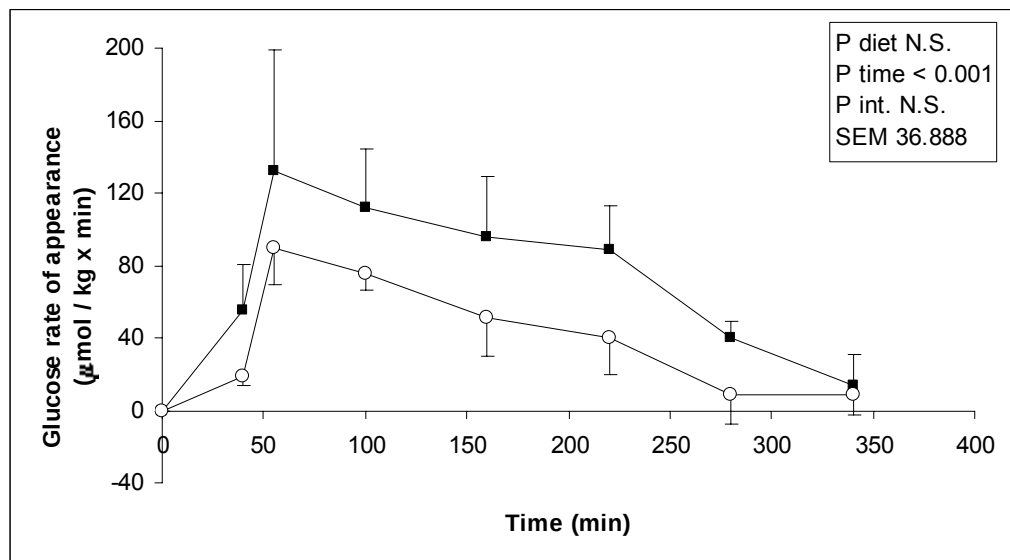
² Probability; N.S. ($P \geq 0.05$).

Figure 6.1. - Plasma glucose (A) and rate of glucose appearance (B) increments in the systemic pool after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch (diet CS, square symbols) or 250 g/kg of raw potato starch (diet RPS, circle symbols). Values are means $\pm$ SEM, n=3.* Different from CS, $P < 0.05$. (Experiment 2)

A



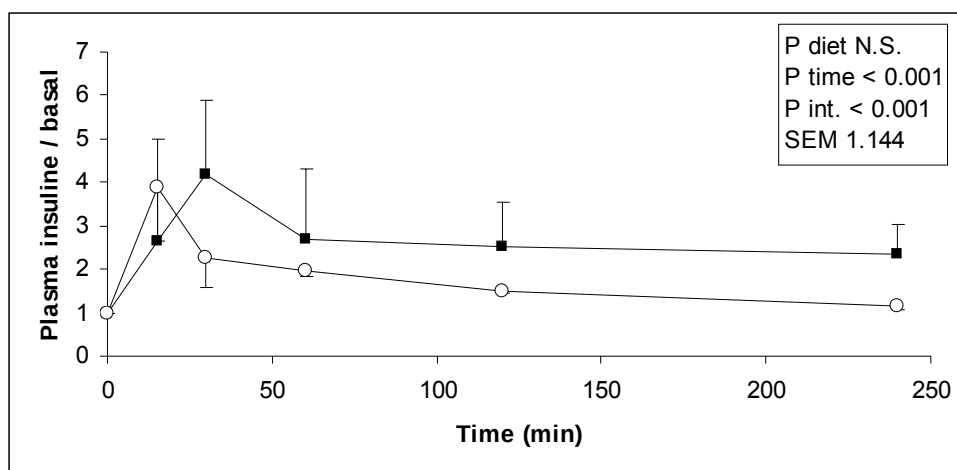
B



6.3.2.2. Peripheral insulin responses

Arterial plasma insulin concentration was $49.8 \pm 13.46 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $84.6 \pm 29.06 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ before the CS and RPS meal, respectively ($P > 0.05$). As a high variability was observed among animals (CV, $39.91 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), insulin postprandial responses (Figure 6.2.) were expressed for each animal as related to the basal insulin concentration (times x basal concentration). Maximum increments over basal state were obtained 30 min after the beginning of the meal for CS (4.2 ± 1.67) and 15 min for RPS (3.9 ± 1.23). Although not significantly differences were observed, AUC of insulin (Table 6.4.) was higher for CS (383.8 ± 170.52 times basal level) than RPS (167.8 ± 32.95 times basal level).

Figure 6.2. - Plasma insulin increments in arterial plasma after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch (diet CS, square symbols) or 250 g/kg of raw potato starch (diet RPS, circle symbols). Values are means $\pm$ SEM, n=3. (Experiment 2).



6.3.2.3. Peripheral acetate responses

Arterial plasma acetate concentration (Table 6.5.) showed remarkable constant values between 5 and 6.5 h postprandial, showing an average value of $259.0 \pm 15.15 \mu\text{mol/L}$ for CS and $312.3 \pm 70.53 \mu\text{mol/L}$ for RPS diet ($P > 0.05$). No significant differences were observed between diets for the isotopic enrichment of acetate through the measurement period, accounting for a rate of appearance of 29.5 ± 2.05 and $25.3 \pm 3.94 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for pigs fed CS and RPS, respectively.

Table 6.5. - Concentration, isotopic enrichment (MPE) and rate of appearance of acetate in the systemic pool after a meal of diets containing 250 g/kg of corn starch (diet CS) or 250 g/kg of raw potato starch (diet RPS). ^{1, 2} (Experiment 2)

	Plasma concentration	Enrichment (MPE)	Rate of appearance
	$\mu\text{mol} / \text{L}$	%	$\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
CS	259.0	6.1	29.5
RPS	312.3	7.4	25.3
SEM	76.26	1.39	4.53
Probability	N.S.	N.S.	N.S.

¹ Values are means, n=3.

² Probability; N.S. ($P \geq 0.05$).

6.4. DISCUSSION

Among the different types of starch, raw potato starch is known to be poorly gelatinised and hydrolysed slowly by α -amylases. In the present study, ileal digestibility of starch (Experiment 1) was 96.9% for CS diet and 75.6% for RPS diet (Martinez-Puig et al, 2003), which reflect an increased amount of starch entering the large bowel of animals fed on RPS and becoming an available source for the colonic microflora.

Tracer infusion and blood sampling (Experiment 2) were proceeded to evaluate rates of appearance of glucose and SCFA in the systemic pool during periods including basal state and postprandial period. As expected the basal state or late postprandial period showed the lowest concentration of glucose and insulin, in ranges comparables with other authors (Noah et al, 2000). After the initiate of the meal, glucose absorption generated the rapid and familiar prandial blood glucose curve. Generally, blood glucose concentration increases up to a maximum, reached within 30-60 min, from which it falls with a second, smaller peak, often obscured by fusion with the down limb of the first surge of glucose (Zierler, 1999). In the present experiment, the areas under glucose concentration, rate of systemic appearance and insulin concentration curves were quantitatively higher in animals receiving diets CS than RPS. These results were consistent with a higher small intestine digestibility of starch observed in animals fed diet CS than RPS.

Glucose is the main carbohydrate absorbed, but other nutrients, such as SCFA from gut fermentation, also supply energy (Yen et al, 1991). In the present experiment we estimated an average rate of appearance of acetate in the systemic pool of $27.3 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. This value is lower than values ($71 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) referred previously by Riis & Grummer (1969) and Freeman et al, (1970) for fed pigs of 60 kg LW, but significantly higher than the $4.6 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ estimated recently in healthy humans (Piloquet et al, 2003). The whole-body turnover of SCFA is known composed of an endogenous peripheral turnover and an exogenous production that depends on dietary intake of non-digestible carbohydrates. The higher values observed in pigs as compared to humans should reflect the higher intake of non-starch polysaccharides and resistant starch. Significant larger amounts of organic matter and starch were fermented in the large bowel of pigs fed on RPS than CS diet, associated with significant increases of SCFA concentration in colonic digesta (Martinez-Puig et al, 2003). However, these changes on SCFA concentration were associated with significant increases of propionate and butyrate and a simultaneous decrease of acetate concentration. These results could explain why we were not able to evidence differences on the acetate concentration or turnover rate between diets. Recent studies with catheterised pigs have shown that the concentration of butyrate and propionate (Bach Knudsen et al, 2003) in the portal vein may be also strongly influenced by the production rates in the large intestine. Unfortunately, we did not measure the rate of peripheral appearance of propionate or butyrate, which resulted in animal fed on RPS the most responsive SCFA to RS fermentation.

Net positive energy balances in growing pigs are mainly expressed as significant increases on fat and protein deposition, and temporally depots of carbohydrates. It is known that exposure to insulin, which dominates the prandial and immediate postprandial period, encourages storage of carbohydrates and fat, while exposure to growth hormone plus insulin in the delayed postprandial period encourages protein synthesis (Newsholme and Dimitriadis, 2001).

Thus, pigs fed on CS showed a greater backfat thickness and higher ACX, ME and G6PDH in subcutaneous, intermuscular and abdominal adipose tissues. This is an evidence for a regulation of pig lipogenesis by a variation in the type and not the amount of starch in the diet. Earlier studies performed in rats demonstrated an increment on the adipose tissue lipogenesis associated at the glycemic index of the starch (Kabir et al, 1998a) and the amylose-amylopectin starch content (Kabir et al, 1998b). The increased lipogenic enzyme activity in adipose tissue is known to occur via

an increased gene transcription regulated by glycemia (Towle et al, 1997) and potentiated by insulin (Girard et al, 1997). The association between glycemia/insulinemia and lipogenesis has also been demonstrated previously for resistant starch which in rats may reduce postprandial insulinemia and fatty acid synthase activity by 20% (Takase et al, 1994; Morand et al, 1994). Moreover, despite SCFA released from hindgut fermentation are known to contribute significantly to the energy absorbed, metabolizable energy value for resistant starch is estimated to be only half value of digested starch absorbed as glucose (Mathers, 1991).

The different lipogenic enzyme activities in adipose tissues between diets were not simultaneous to muscular tissue responses. This could be determined by the restricted feed intake which could impair lipogenesis in muscular tissues in both treatments. Nevertheless it could be argued the existence of differences between intramuscular and extramuscular fat depots in the mechanisms that regulates the expression of lipogenic enzymes by carbohydrate. D-glucose is recognized the transport form of carbohydrate and an important fuel for stocking metabolic engines in all mammalian cells. However, it is not the major fuel for either the beating heart (Bing et al, 1954) or skeletal muscle at rest (Andres et al, 1956); free fatty acids are. Moreover, differences on the intermediate transcriptional metabolism have been evidenced between adipose and muscular tissues. The activity of G6PDH in 60 kg LW pigs is considered negligible compared to that of the malic enzyme in muscle (1:10), whereas equivalent values have been referred in external and intermuscular fat tissues (Mourot and Kouba, 1998). Supply of NADPH in muscle is mostly provided by the malic enzyme activity and not by the pentose phosphate way; which could explain why muscle appeared less sensitive than adipose tissue to variations on the peripheral glucose.

Present results are an evidence of a major influence of dietary type of starch on adipose tissue lipogenesis, but not in muscular tissue. However, we were not able to determine specific nutrient influences, either from glucose or SCFA, on lipogenesis, due to the difficulty of separating metabolizable energy intake and nutrients absorbed. Further studies considering the influence of dietary starch on lipogenesis should be evaluated in swine considering ad libitum conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the CICYT funded Project AGL2001-2621-CO2-01.

6.5. REFERENCES

- Allee GL, Romsos DR, Leveille GA & Baker DH (1972) Lipogenesis and enzymatic activity in pig adipose tissue as influenced by source of dietary fat. *J Anim Sci*, 35: 41-7.
- Andres R, Cader G & Zieler KL (1956) The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state. Measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production. *J Clin Invest*, 35: 671-682.
- Bach Knudsen KE, Serena A, Canibe N & Juntunen KS (2003) New insight into butyrate metabolism. *Proc Nutr Soc*, 62: 81-86.
- Bing RJ, Siegel A, Ungar I & Gilbert M (1954) Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med*, 16: 504-515.
- Candek-Potokar M, Lefaucheur L, Zlender B & Bonneau M (1999) Effect of slaughter weight and/or age on histological characteristics of pig longissimus dorsi muscle as related to meat quality. *Meat Sci*, 52: 195-203.
- Cannon JE, Morgan JB, Heavner J, McKeith FK, Smith GC & Meeker DL (1995) Pork quality audit: a review of the factors influencing pork quality. *J Musc Foods*, 6: 369-402.
- Champ M (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr*, 46: 551-562.
- Chang HC, Seidman I, Teebor G & Lane DM (1967) Liver acetyl-CoA-carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 28: 682-876.
- Chakrabarty K & Leveille GA (1968) Influence of periodicity of eating on the activity of various enzymes in adipose tissue, liver and muscle of the rat. *J Nutr*, 96: 76-82.

- Chakrabarty K & Leveille GA (1969) Acetyl-CoA-carboxylase and fatty acid synthetase activities in liver and adipose tissue of meal fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 131: 1051-1054.
- De Bodo RC, Steele R, Altszuler N, Dunn A & Bishop JS (1963) On the hormonal regulation of carbohydrate metabolism; studies with C14 glucose. *Recent Prog Norm Res*, 19: 445-448.
- Fitch WM, Hill R & Chaikoff IL (1959) The effect of fructose feeding on glycolytic enzyme activities of the normal rat liver. *J Biol Chem*, 234: 1048-1051.
- Freeman CP, Noakes DE & Annison EF (1970) The metabolism of glucose, acetate, palmitate, stearate and oleate in pigs. *Br J Nutr* 24: 705-716.
- Gandemer G, Pascal G & Durand G (1983) Lipogenic capacity and relative contribution of the different tissues and organs to lipid synthesis in male rat. *Reprod Nutr Dev*, 23: 325-352.
- Girard J, Ferré P & Fougère F (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Ann Rev Nutr*, 17: 325-352.
- Glinsmann WH, Irausquin H & Park YK (1986) Evaluation of health aspects of sugars contained in carbohydrate sweeteners. *J Nutr*, 116: S1-216.
- Hsu RY & Lardy HA (1969) Malic enzyme. In: *Methods in Enzymology* No. 17 (Lowenstein, JM), pp. 230-235. Academic Press, New York.
- Kabir M, Rizkalla SW, Quignard-Boulange A, Guerre-Millo M, Boillot J, Ardouin B, Luo J & Slama G (1998a). A high glycemic index starch diet affects lipid storage-related enzymes in normal and to a lesser extent in diabetic rats. *J Nutr*, 128: 1878-1883.
- Kabir M, Rizkalla SW, Champ M, Luo J, Boillot J, Bruzzo F & Slama (1998b) Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr*, 128: 35-43.

- Karlsson A, Enfält AC, Essén-Gustavsson B, Lundström K, Rydhmer L & Stern S (1993) Muscle histochemical and biochemical properties in relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs. *J Anim Sci*, 71: 930-938.
- Martinez-Puig D, Perez JF, Castillo M, Andaluz A, Anguita M, Morales J & Gasa J (2003) Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *J Nutr*, 133: 134-139.
- Mathers JC (1991) Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. *Proc Nutr Soc*, 50:161-172.
- Morales J, Perez JF, Baucells MD, Mourot J & Gasa J (2002) Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn- and corn-sorghum-acorn based diets. *Liv Prod Sci*, 77: 195-205.
- Morand C, Levrat M, Bzesson C, Demingué C & Révész C (1994) Effect of arich diet in resistant starch on hepatic lipid metabolism in the rat. *J Nutr Biochem*, 5: 138-144.
- Mourot J & Kouba M (1998) Lipogenic enzyme activities in muscle of growing Large White and Meishan pigs. *Lives Prod Sci*, 5: 127-133.
- Müller MJ, Paschen U & Seitz HJ (1984) Effect of ketone bodies on glucose production and utilization in the miniature pig. *J Clin Invest*, 74: 249-261.
- National Research Council (1998) Nutrient requirements of swine, 10th edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- Newsholme EA & Dimitriadis G (2001) Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109: S122-S134.
- Nishina PM & Freedland RA (1990) Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr*, 120: 668-673.

- Noah L, Krempf M, Lecannu G, Maugère P & Champ M (2000) Bioavailability of starch and postprandial changes in splanchnic glucose metabolism in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E181-E188.
- O'Hea HE & Leveille GA (1969) Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *J Nutr*, 99: 338-344.
- Piloquet H, Ferchaud-Roucher V, Duengler F, Zair Y, Maugere P & Krempf M (2003) Insulin effects on acetate metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E561-565.
- Pouteau E, Vahedi K, Messing B, Flourie B, Nguyen P, Darmaun D & Krempf M (1998) Production rate of acetate during colonic fermentation of lactulose: a stable-isotope study in humans. *Am J Clin Nutr*, 68: 1276-1283.
- Riis PM & Grummer RH (1969) The relationship between glucose and fatty acid metabolism in pigs under various feeding conditions. *Acta Agricultura Scandinavica*, 19: 11-17.
- SAS Institute, Inc. (1996) SAS/ STAT User's Guide. Version 6, 4th edition, vol. 1. SAS Institute, Cary, NC.
- Shillabeer G, Hornford J, Forden JM, Wong NC & Lau DC (1990) Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high fat diets in the rat. *J Lipid Res*, 31: 623-631.
- Steele R (1959) Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann J Physiol Endocrinol Metab*, 275: E641-E648.
- Sunehag A, Ewald U & Gustafsson J (1996) Extremely preterm infants (<28 weeks) are capable of gluconeogenesis from glycerol on their first day of life. *Pediatr Res*, 36: 553-557.
- Takase S, Goda T & Watanabe M (1994) Monoestaryl-glycerol-starch complex: its digestibility and effects on glycemic and lipogenic responses. *J Nutr Sci Vit*, 40: 23-26.

- Towle HC, Kaytor EN & Shih HM (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Ann Rev Nutr*, 17: 405-433.
- Wolever TMS, Spadafora PJ, Cunnane SC & Pencharz PB (1995) Propionate inhibits incorporation of colonic [1,2-¹³C] acetate into plasma lipids in humans. *Am J Clin Nutr*, 61: 1241-7.
- Wood JD (1990) Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. In: *Reducing Fat in Meat Animals* (Wood, J.D. & Fischer, A.V.), pp. 344-397. Elsevier Applied Science, London.
- Yen JT, Nienaber JA, Hill DA & Pond WG (1991) Potential contribution of absorbed volatile fatty acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. *J Anim Sci*, 69: 2001-2012.
- Zierler K (1999) Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol*, 276: E409-426.

CAPÍTULO 7

ANEXO I: Evolución del peso vivo y contenido de grasa intramuscular de cerdos alimentados con dietas de almidón de maíz y almidón crudo de patata durante los periodos de crecimiento y acabado

7.1. INTRODUCCIÓN

En la primera prueba experimental se observó que el almidón crudo de patata (ACP) era parcialmente resistente a la digestión enzimática en intestino delgado de cerdos en crecimiento y en consecuencia, en la segunda prueba experimental se determinó que su inclusión en la dieta producía una glicemia posprandial inferior a la obtenida con la dieta de almidón de maíz (AM). También se observó que las diferencias en los flujos de glucosa a la circulación periférica, promovidas por las dietas experimentales, repercutían en la actividad enzimática de los enzimas lipogénicos de los diferentes depósitos grasos: subcutáneo, intermuscular y abdominal. Sin embargo no se detectaron diferencias en la actividad lipogénica de los diferentes tejidos musculares analizados (*longissimus dorsi*, *longissimus thoracis* y *gluteus medius*). En la primera prueba experimental los animales estuvieron sometidos a un régimen de alimentación restringido y se sacrificaron con aproximadamente tres meses y medio de edad. Por este motivo, no se pudo discernir si la diferente respuesta observada entre los tejidos grasos y musculares respondía a diferentes mecanismos de control de la lipogénesis entre tejidos, o simplemente era resultado del diseño experimental. En este sentido cabe destacar que la actividad lipogénica en los tejidos musculares presenta su mayor ritmo de crecimiento a partir de los 4 meses de edad (Mourot y Kouba, 1999) y los animales se sacrificaron antes, de tal forma que no se pudo estudiar el impacto de las dietas cuando la actividad lipogénica presenta su mayor actividad, lo cual podría haber condicionado los resultados obtenidos. Con el fin de clarificar cual es el impacto de la inclusión dietética de almidón resistente sobre la lipogénesis en tejidos musculares, se diseñó una tercera prueba en que los animales fueron alimentados *ad libitum* y no se sacrificaron hasta los cinco meses de edad. Sin embargo, en este experimento no se pudieron analizar las actividades enzimáticas de los enzimas lipogénicos en los tejidos grasos y musculares, debido a una interrupción accidental en la cadena de frío de conservación de las muestras. Por este motivo en el presente anexo solamente se describen los resultados de la evolución del peso vivo de los animales y el contenido en grasa de los tejidos musculares.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La prueba experimental se llevó a cabo en las Granjas Experimentales de la Universidad Autónoma de Barcelona después de recibir aprobación por parte del Comité de Experimentación Animal de la institución de acuerdo con la legislación

vigente sobre el uso y cuidado de animales para la investigación (European Union Regulations on Animal Care).

7.2.1. Animales y dietas

Se utilizaron dieciseis cerdos (Landrace x Large White) de 20.69 ± 0.68 kg de PV. Al llegar a la granja experimental se halojaron individualmente y se dividieron aleatoriamente en dos grupos alimentados con dos dietas diferentes, una de ellas contenía 250 g/kg de AM y la otra 250 g/kg de ACP. Ambas dietas (tabla 1) se formularon de acuerdo con las recomendaciones del (NRC, 1998), que son 13972 kJ EM/kg, 165.4 g PB/kg y 10.8 g lisina/kg, assumiendo un contenido energético del almidón de 16720kJ EM/kg. Enzimáticamente (Champ, 1992) se determinó que el AM contenía 187g/kg de almidón resistente y el ACP 637 g/kg. Después de 8 semanas y con un peso vivo de 61.2 ± 1.12 kg de PV las dietas fueron adaptadas a los requerimientos nutreicos de los animales (dieta de acabado: 13972 kJ EM/kg, 146.7 g PB, 9.5 g lisina/kg) y la cantidad de almidón se incrementó a 350 g/kg de AM y 350 g/kg de ACP. Las dietas fueron ofrecidas ad libitum durante todo el periodo experimental que fue de 8 semanas consumiendo la dieta de crecimiento y 6 semanas consumiendo la dieta de acabado.

7.2.2. Procedimientos experimentales

Se registró el peso de los animales al principio del experimento (dia 0), al final de la fase de crecimiento (día 55) y al final de la fase de acabado (día 97), durante la cual también se registró el consumo de pienso. El día 97, todos los animales fueron eutanasiados con una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (200 mg/kg PV). Inmediatamente se tomaron muestras de los músculos longissimus dorsi y longissimus thoracis y se congelaron a -18°C . Posteriormente las muestras se liofilizaron para determinar su contenido en grasa intramuscular.

7.2.3. Procedimientos analíticos

El análisis químico de las dietas se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos por el AOAC (1995) para las cenizas y proteína bruta. La fibra neutro detergente (FND) se analizó según el método de Goering y Van Soest (1970), y el almidón según la técnica descrita por Theander (1991). El contenido lipídico de los tejidos musculares se analizó segun el método AOAC (1995) utilizando el procedimiento de extracción Soxhlet.

Tabla 7.1. - Composición y análisis de nutrientes de los piensos experimentales ofrecidos a los cerdos entre 21 y 61 kg de PV (Crecimiento) y entre 61 y 94 kg de PV (Acabado)

Piensos	Crecimiento		Acabado	
	AM	ACP	AM	ACP
Ingredientes (g kg ⁻¹)				
Almidón de maíz	250	-	350	-
Almidón crudo de patata	-	250	-	350
Cebada	451	451	389	389
Harina de soja	199	199	215	215
Harina de soja extrusionada	66	66	14	14
Fosfato dicálcico	15	15	10	10
Carbonato cálcico	6.7	6.7	9.8	9.8
Salt	5	5	5	5
L-Lisina	2	2	1.8	1.8
DL-Metionina	1.2	1.2	1.2	1.2
L-Treonina	0.9	0.9	1	1
Premix*	2	2	2	2
Cr ₂ O ₃ [†]	1.5	1.5	1.5	1.5
Análisis de nutrientes (g kg ⁻¹ MS)				
Proteína Bruta	167.8	165.1	148.9	144.1
Cenizas	78.2	70.4	62.1	63.8
Almidón	447.0	453.8	572.4	589.7
FND	222.3	219.0	194.0	191.2

*Premix (contiene por kg de pienso): CaCO₃ 12.3g, CaHPO₄ 9g, NaCl 2g, vitamina A, 2,100 µg; vitamina D₃, 45 µg; tocoferol, 10 mg; vitamina K₃, 1 mg; tiamina, 1 mg; riboflavina, 4 mg; piridoxina, 2 mg; cianocobalamina, 20 µg; biotina, 10 µg; niacina, 18 mg; Ca-d-pantothenic acid, 10 mg; colina, 175 mg. Minerales: Fe, 80 mg; Zn, 110 mg; Cu, 90 mg; Mn, 50 mg; Co, 0.1 mg; I, 1 mg; Se, 0.2 mg.

150 mg de Etoxiquin® como antioxidante y 500 mg de Luctamold® como fungicida se añadieron a las 2 dietas por kg de pienso.

[†] Carlo Erba®, Milan, Italy.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectaron diferencias entre tratamientos en la evolución del peso vivo durante los periodos de engorde y acabado (tabla 2). Sin embargo, en la fase de acabado el consumo de pienso fue numéricamente superior en el tratamiento de patata (4.0 kg/d) respecto al de maíz (3.7 kg/d), aunque las diferencias no alcanzaron significación

estadística. Probablemente el número de animales utilizado en esta prueba (n=8) sea insuficiente para detectar variaciones en parámetros que presentan una elevada variabilidad asociada, como es el caso del peso corporal o el consumo de pienso.

Es necesario resaltar que los consumos de pienso obtenidos son anormalmente altos en comparación con los datos registrados habitualmente con animales de líneas genéticas similares a la misma edad (entorno a 2.5 - 2.7 kg/d). Esto indica, que en nuestra granja experimental, probablemente los animales tiraron una cantidad importante de pienso que no fue contabilizado. Sin embargo, si asumimos que las pérdidas de pienso fueron homogéneas entre grupos experimentales, la comparación entre tratamientos podría seguir siendo válida.

Tabla 7.2. - Evolución del peso vivo (kg) durante las fases de engorde y acabado de cerdos alimentados con dietas que contenían almidón de maíz (AM) o almidón crudo de patata (ACP).*

	AM	ACP	SEM	Probabilidad
Peso vivo (kg)				
Peso inicial (día 0)	21,31	20,07	1,014	N.S.
Fase crecimiento (día 55)	61,81	60,69	1,701	N.S.
Fase acabado (día 97)	93,00	92,28	1,27	N.S.

* Los valores son medias (n=8)

NS, $P \geq 0.05$

En la tabla 3 se presentan los resultados del contenido de grasa intramuscular de los músculos longissimus dorsi y longissimus thoracis. En ambos músculos se observa que el contenido de grasa es superior en los cerdos alimentados con la dieta de AM respecto a los alimentados con la dieta ACP, aunque las diferencias solo alcanzan significación estadística en el caso del longissimus dorsi, ya que en el longissimus thoracis la variabilidad de los resultados es superior. Las diferencias observadas entre tratamientos en el contenido de grasa intramuscular parecen reflejar que las diferencias en la glicemia promovidas por la administración de diferentes tipos de almidón (descritas en el segundo experimento y revisadas anteriormente por Higgins, 2004), también repercuten sobre la lipogénesis en los tejidos musculares. Con estos resultados sería razonable esperar que en caso de haber podido determinar las actividades de los enzimas lipogénicos en los tejidos musculares, se habría detectado

mayor actividad en los procedentes de animales alimentados con la dieta AM que con la dieta ACP. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que la falta de diferencias en la actividad lipogénica de los tejidos musculares observada en la primera prueba experimental podría responder a las características del diseño del estudio (insuficiente edad del sacrificio, régimen de alimentación restringido), y no a diferentes mecanismos de regulación entre tejidos musculares y adiposos.

Tabla 3. Contenido en grasa intramuscular (g/kg MS) determinado en los tejidos musculares (longissimus dorsi y longissimus thoracis) de cerdos alimentados con dietas que contenían almidón de maíz (AM) o almidón crudo de patata (ACP).

	AM	ACP	SEM	Probabilidad
Grasa intramuscular (g/kg DM)				
Longissimus thoracis	92,00	89,71	11,491	N.S.
Longissimus dorsi	62,70	44,00	5,622	<0,05

* Los valores son medias (n=8)

NS, $P \geq 0.05$

7.4. BIBLIOGRAFIA

AOAC (1995) Official Methods of Analysis (16th Ed). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.

Champ MM (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. European Journal of Clinical Nutrition, 46 Suppl 1: s51-s61.

Goering HK & Van Soest PJ (1970) Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook nº 379. Washington, DC: ARS and USDA.

Higgins JA (2004) Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. J AOAC Int, 87(3): 761-768.

Mourot J y Kouba M (1999) Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing Large White and Meishan pigs. Reproduction, Nutrition, Development, 39: 125-132.

National Research Council (NRC) (1998) Nutrient requirements of Swine. 10ª edición revisada ed. National Academy Press, Washington, D.C. (USA).

Theander O (1991) Chemical analysis of lignocellulosic materials. Anim Feed Sci Technol 32, 35-44.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

El almidón constituye la principal fuente de energía en las dietas de los animales monogástricos y es también importante en el caso del hombre. Sin embargo, hasta la pasada década no se rebatieron dos asunciones generales relativas a su digestión que hoy se consideran erróneas. La primera de ellas es que el almidón, debido a su elevado peso molecular, se hidroliza y absorbe más lentamente que los azúcares simples o disacáridos. Diversos estudios in vitro e in vivo han demostrado que es la forma física y procesado del alimento, y no el grado de polimerización, el principal determinante del ritmo de digestión de almidones y azúcares (Wong y O'Dea, 1983; Englyst et al, 1996). La segunda asunción corregida es que el almidón es completamente hidrolizado y absorbido en intestino delgado. Actualmente se conoce que el grado de digestión del almidón en intestino delgado es variable y que dependiendo de su forma física y procesado, parte del almidón escapa a la digestión en intestino delgado y entra a intestino grueso donde puede ser fermentado. En 1992 Asp definió el concepto de almidón resistente como la suma del almidón y los productos de su degradación que escapan a la digestión enzimática en intestino delgado.

El ritmo y extensión de la digestión enzimática del almidón en intestino delgado, no tan solo determina la cantidad de glucosa absorbida y por lo tanto, la energía disponible de oxidación o síntesis para el crecimiento y deposición de tejido graso; sino que también condiciona la cantidad de materia orgánica que alcanza el tracto digestivo posterior y es sustrato para la fermentación microbiana. A su vez, las características de la fermentación en intestino grueso tienen consecuencias tanto sobre el balance energético general del animal, como sobre la salud intestinal y resistencia a infecciones microbianas.

En los estudios descritos escogimos almidón de maíz y patata cruda, con objeto de provocar una variación importante en el almidón teóricamente digestible a nivel ileal, y por lo tanto en el flujo de almidón al tracto digestivo posterior (Mathers et al, 1997; Martin et al, 1998). En su forma nativa, el almidón de patata es un ejemplo clásico de almidón resistente tipo 2 (Englyst et al, 1992) debido a que presenta un patrón de difracción tipo B (Gallant et al, 1992) y está constituido por gránulos esféricos de gran tamaño (Björk, 1996). En cambio, el almidón de maíz está constituido por gránulos de menor tamaño y presenta un patrón de difracción tipo A, por lo que se trata teóricamente de un almidón con un alto grado de digestibilidad.

Como se presentó inicialmente, utilizando estos dos ingredientes se planteó estudiar en un modelo de cerdo en crecimiento: (1) la evolución de la capacidad de digestión del almidón resistente, así como las estrategias que pueden desarrollar los animales para adaptar su digestión tras varios periodos de adaptación y diferentes regímenes de alimentación, (2) las consecuencias metabólicas, a nivel de tejido graso de la administración de los diferentes tipos de almidón, y por último (3) las consecuencias de los diferentes flujos de almidón sobre parámetros relacionados con la salud intestinal.

8.1. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO

Tanto en los estudios in vitro como in vivo, se ha demostrado que el almidón crudo de patata (ACP) se digiere en menor medida que el almidón de maíz (AM) en intestino delgado. Sin embargo, en nuestras pruebas experimentales la digestibilidad in vivo fue superior que la determinada in vitro según la técnica descrita por Champ et al (1992), tanto para el almidón de maíz (97 vs. 85%) como de patata (76 vs 59%).

Las diferencias observadas entre los métodos in vivo e in vitro pueden responder a diferentes factores. En primer lugar, las técnicas de determinación de almidón resistente (Champ et al, 1992; Englyst et al, 1992) han sido validadas para humanos ileostomizados y no para el cerdo, por lo que no se puede excluir la posibilidad que cierta cantidad de almidón enzimáticamente resistente para humanos, pueda ser digerido por el mayor potencial enzimático del cerdo, como demuestran los resultados obtenidos por Heijnen y Beynen (1997) y Govers et al (1999). En segundo lugar, no se puede descartar que una mayor digestión en intestino anterior del cerdo pueda ser resultado de una mayor capacidad fermentativa en intestino delgado, sobretodo en el último tercio donde habitan cantidades significativas de bacterias ($\approx 10^8$ - 10^9 UFC/g digesta; Back Knudsen et al, 1993; Chesson et al 1985; Liu et al, 1985). Además, en nuestra determinación del almidón resistente in vitro, no se realizó una etapa de proteolisis con tripsina y pepsina previa a la digestión con amilasas (Englyst et al, 1992) para liberar el almidón encapsulado en matriz proteica. Si bien el almidón de patata no es resistente a la digestión enzimática debido a la existencia de una matriz proteica especialmente densa como puede ser el caso del sorgo (Rooney y Pflugfelder, 1986) o de las alubias (Tovar et al, 1990), la falta de proteolisis también podría justificar en parte las diferencias observadas.

En cuanto a los valores de digestibilidad ileal del almidón es interesante destacar que nuestros resultados confirman una digestión incompleta del almidón, especialmente cuando se incorpora almidón resistente procedente de patata. Tradicionalmente, se ha considerado que el almidón se digiere completamente en intestino delgado y los sistemas de valoración energética abundan en este sentido. Sin embargo, son numerosos los trabajos que identifican cantidades de almidón en la digesta ileal de humanos ileostomizados (Sandstrom et al 1986; Englyst et al 1987; Livesey et al 1995) y animales (Tovar et al 1992; Topping et al, 1997). En el cerdo, la presencia de fracciones de almidón resistentes a la digestión enzimática puede ser más frecuentemente asociada a animales jóvenes recién destetados (Omogbenigun et al 2004; Hopwood et al, 2004) o a la inclusión de ingredientes más resistentes (ej. almidón de patata o legumbres), molienda grosera (Owsley et al, 1981; Bach Knudsen and Jorgensen, 2001) o ingredientes del pienso viscosos (Classen y Bedford, 1991).

En estudios con cerdos canulados en la entrada del ciego, Martin et al, (1998) obtuvieron digestibilidades ileales del almidón crudo de patata del 44% tras un periodo de adaptación a la dieta de 8 días. En nuestra primera prueba experimental, después de 38 días de administración de las dietas experimentales, la digestibilidad ileal del almidón de la dieta enriquecida con almidón crudo de patata alcanzó valores del 76%. Las diferencias en la digestibilidad ileal del almidón observado entre ambas pruebas, con periodos de adaptación de 8 y 38 días respectivamente, podrían reflejar fundamentalmente la presencia de dos tipos de almidón más o menos digestible, pero también podrían responder teóricamente a dos mecanismos de adaptación. En primer lugar, se podría haber producido una adaptación de la expresión de enzimas digestivos de la mucosa intestinal, en respuesta a un cambio de sustrato (McCracken, 1984; Kelly et al 1991a; 1991b). En segundo lugar, podría existir una selección bacteriana en las porciones más distales del intestino delgado, que fermentaría parte del almidón resistente a la digestión enzimática. En cualquier caso, la digestibilidad ileal del almidón de patata no continua incrementándose más allá de 38 días de adaptación, como lo demuestran los resultados obtenidos en nuestra tercera prueba experimental en que tras un periodo de adaptación de 97 días, no se observaron cambios respecto a la primera prueba en la digestibilidad ileal del almidón de patata (76 vs 75%).

Por último, la menor disponibilidad de glucosa en el tratamiento de patata era de esperar que tuviera repercusiones en los rendimientos productivos de los animales. Efectivamente, en la primera prueba experimental con un régimen de alimentación

restringido se observaron pesos finales de la canal significativamente inferiores (44.75 vs 48.5 kg; $P < 0.05$) en el tratamiento de patata asociado a peores índices de conversión (2.30 vs 2.17). En la tercera prueba experimental, en que los animales fueron alimentados ad libitum, no se registraron diferencias en el peso final de los animales, debido a que los cerdos alimentados con almidón de patata incrementaron su consumo en un 9%, empeorando su IC en un 6%.

8.2. CONSECUENCIAS DE LA DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO DELGADO

El ritmo y la extensión de la digestión de almidón en intestino delgado determinan la disponibilidad de glucosa libre, y en consecuencia el flujo de glucosa a sangre portal. Por lo tanto, los almidones con peores índices de digestibilidad deberían promover menores glicemias e insulinemias posprandiales que los almidones altamente digestibles. Sin embargo, la información disponible en la bibliografía pertenece mayoritariamente a estudios realizados en humanos, en los cuales los resultados obtenidos han sido contradictorios. Higgins (2004) integrando la información disponible concluyó que para poder detectar reducciones en la glicemia e insulinemia posprandial es necesario administrar un valor mínimo de almidón resistente respecto al total que se situaría entorno al 14%. Sin embargo otros factores son determinantes a la hora de evaluar el impacto del almidón resistente sobre la glicemia e insulinemia, como el contenido de grasa y fibra de la dieta. La grasa dietética puede afectar la accesibilidad de los enzimas digestivos a los carbohidratos, así como la motilidad intestinal y vaciado gástrico, de tal forma que si no se equilibra el contenido de grasa de las dietas experimentales, los resultados pueden resultar alterados. Algunos autores (Higgins et al, 2004) consideran el almidón resistente como fibra dietética y equilibran las dietas experimentales para que tengan el mismo contenido en fibra. Evidentemente en estos estudios, la inclusión de almidón resistente no disminuye la glicemia e insulinemia posprandial. En nuestras pruebas experimentales, los niveles de almidón resistente respecto al total de almidón, se sitúan en un 15% en el tratamiento de maíz, y en un 40% en el de patata. Además, en nuestros estudios el almidón resistente se introduce en la dieta sustituyendo a almidón digestible y no a fibra dietética. De esta forma, el nivel de variación en la cantidad de almidón resistente respecto al total (15 vs 40%) fue suficiente para promover diferencias tanto en la glicemia e insulinemia posprandial, como en el ritmo de aparición de glucosa en la circulación sistémica.

En términos energéticos la incorporación de un mayor porcentaje de almidón en forma de almidón resistente determina un descenso en la cantidad de energía disponible en intestino delgado y un incremento en la cantidad de energía absorbida en forma de ácidos grasos volátiles. Transitoriamente, antes de que el tracto digestivo se adapte a la llegada de almidón resistente se observó también una menor digestibilidad aparente en todo el tracto digestivo, lo que redundó en una menor disponibilidad energética. Según diferentes autores (Jensen 2001; Livesey 1990) la eficiencia energética de la fermentación del almidón respecto a su hidrólisis enzimática es aproximadamente del 45%. En este sentido, y considerando los valores de digestibilidad ileal y rectal del almidón en el primer ensayo podemos calcular que tras el periodo de adaptación, la cantidad de energía digerida y absorbida en forma de glucosa y AGV procedente del almidón fue inferior en aproximadamente un 12% en el tratamiento de almidón de patata respecto al de maíz. En el primer ensayo, los animales estuvieron restringidos y no pudieron compensar la menor disponibilidad energética. Sin embargo, en el tercer ensayo en el que los animales recibieron el pienso a voluntad las diferencias entre dietas en la cantidad de energía procedente del almidón se redujo al 2%, debido a que los animales que recibieron la dieta de almidón de patata incrementaron su consumo respecto a los alimentados con almidón de maíz.

Es conocido, que los niveles plasmáticos de glicemia e insulinemia regulan el depósito de tejidos grasos a través de la regulación de la expresión génica de los enzimas relacionados con la lipogénesis (Towle et al, 1997; Girard et al, 1997). La administración de almidón resistente, se ha relacionado con el peso del tejido adiposo (DeDeckere et al, 1993), el tamaño de los adipocitos (Kabir et al, 1998; Kishida et al, 2001) y la actividad del enzima ácido graso sintetasa (Takase et al, 1994; Younes et al, 1995a). En nuestro primer experimento, la administración de almidón de patata redujo la actividad de los enzimas lipogénicos ACX, EM y G6PDH en los tejidos subcutáneo, intermuscular y abdominal. En consecuencia, el grosor del tejido adiposo subcutáneo dorsal fue superior en los cerdos alimentados con almidón de maíz. Sin embargo, no se detectó ningún efecto en la actividad enzimática de los enzimas lipogénicos en los diferentes tejidos musculares analizados ni en su contenido en grasa intramuscular. Estos resultados parecen indicar que los mecanismos que regulan la expresión de los enzimas lipogénicos varían según el tipo de tejido graso. Sin embargo, otros factores podrían enmascarar los resultados en el primer experimento: el primero de ellos, es que los animales estuvieron sometidos a un régimen de alimentación restringido, lo cual podría perjudicar la lipogénesis intramuscular en ambos tratamientos. A parte, cabe destacar que el depósito de grasa

intramuscular es el último en formarse, presentando su mayor ritmo de crecimiento a partir de los 4 meses de edad (Mourot y Kouba, 1999). En nuestra primera prueba experimental los animales fueron sacrificados con aproximadamente tres meses y medio de edad, con lo cual la absorción de energía y la actividad lipogénica en los tejidos musculares no estaba plenamente activa. En consecuencia, la actividad de los enzimas lipogénicos de los tejidos musculares respecto a los tejidos adiposos representa solamente entre un 17% (ACX) y un 0.8% (G6PDH). Efectivamente, en el tercer experimento en que los animales se alimentaron ad libitum durante 5 meses y medio, la inclusión de almidón resistente redujo el contenido en grasa intramuscular de Longissimus dorsi en un 30%, indicando que en los tejidos musculares la lipogénesis también se altera en respuesta a la administración de almidón resistente.

8.3. DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN EN INTESTINO GRUESO

La reducida digestión del almidón resistente en intestino delgado, provoca un flujo de materia orgánica al intestino grueso que servirá como sustrato fermentativo. Tanto en cerdos (Longland et al, 1993) como en ratas (Brunsgaard et al, 1995) se ha demostrado que tras un corto periodo de adaptación, el intestino grueso es capaz de fermentar la práctica totalidad del almidón que recibe. En nuestros experimentos, la administración de almidón de patata incrementó el flujo de almidón a intestino grueso en aproximadamente un 20% del almidón total ingerido. En la primera y tercera prueba, la excreción fecal de almidón fue casi nula a partir del primer control experimental (a 9 y 11 días). Sin embargo, la administración de almidón de patata produjo una disminución en la digestibilidad fecal de MO, que no se compensó hasta pasados 38 y 45 días en la primera y tercera prueba respectivamente. En la tercera prueba experimental se determinó que la reducción en la digestibilidad total de la MO observada a corto plazo, fue consecuencia de la excreción fecal de FND. Estudios previos (Phillips et al, 1995; Cummings et al, 1996) ya habían demostrado que la administración de almidón resistente provoca un incremento en la excreción fecal de FND, probablemente debido a una mayor afinidad de las bacterias fermentativas para el almidón que para los polisacáridos no amiláceos (PNA). Sin embargo este efecto de sustitución dependerá posiblemente de la accesibilidad de los PNA para ser fermentados, ya que sustratos poco fermentables se verán poco afectados por la fermentación del almidón. Govers et al (1999) demostró, que la adición de almidón resistente no interfería en la fermentación del salvado de trigo. Sin embargo, la aceleración en el tiempo de tránsito producida por el salvado sí que desplazó la fermentación del almidón de colon proximal a distal.

El mayor flujo de almidón a intestino grueso también disminuyó la digestibilidad fecal aparente de la PB. En el primer experimento, 38 días de adaptación fueron insuficientes para compensar el incremento en la excreción fecal de proteína en los animales alimentados con almidón de patata, mientras que en el tercer experimento, las diferencias permanecieron a los 45 días e incluso a los 97, aunque en este punto ya no presentaron significación estadística. Existen diferentes explicaciones posibles del incremento en la excreción fecal de nitrógeno. En primer lugar, el mayor flujo de material indigestible en intestino delgado podría dificultar la digestión de la proteína de la dieta, disminuyendo la digestibilidad real de la proteína (Kritchevsky, 1988). En segundo lugar, no se puede descartar que la proteína excretada por vía fecal sea de origen endógeno o incluso microbiano. En este sentido, diferentes autores (Younes et al, 1995b; Tetens et al, 1996) han evidenciado incrementos en el flujo de N endógeno en tracto digestivo posterior asociado al aporte de mayores cantidades de fibra dietética. Por otra parte, puede también indicarse una mayor contribución al N fecal procedente de la población microbiana que fermenta aquellos sustratos que alcanzan el tracto digestivo posterior. Teóricamente, el porcentaje de N fecal de origen microbiano, que se estima entre el 60-90% (Mosenthin et al 1992), puede variar en función de la dinámica de fermentación a lo largo del tracto digestivo posterior. En nuestras pruebas experimentales se observó que la excreción fecal de bases púricas, que son un indicador de la proliferación bacteriana, y por lo tanto del N microbiano, fue superior en los tratamientos que contenían almidón resistente. Por lo tanto, se podría señalar que la presencia de sustrato fermentable, incrementa la biomasa bacteriana en los compartimentos intestinales más caudales y en consecuencia incrementa la excreción de N microbiano, reduciendo la digestibilidad aparente del N. En la primera prueba experimental, el estudio de la concentración de las bases púricas a lo largo del tracto digestivo posterior avaló esta hipótesis. En el tratamiento de maíz, la fermentación del almidón tiene lugar mayoritariamente en ciego, donde existe una elevada concentración de bases púricas. A partir de este compartimiento, el agotamiento del sustrato fermentable orienta la población microbiana hacia la degradación de material proteico y a su autólisis. El resultado de esta degradación proteica será la liberación de amoníaco, que podría ser absorbido y convertido en urea, así como productos potencialmente tóxicos como indoles, aminas y fenoles (Macfarlane et al, 1988; Gibson et al, 1989). En cambio, con el tratamiento de patata cierta cantidad de sustrato fermentable alcanza colon distal y recto, de tal forma que la autólisis bacteriana, expresada como reducción en la concentración de bases púricas entre colon y recto, es menor; y por lo tanto es mayor la excreción fecal de N bacteriano y menor la absorción de amoníaco.

En la primera prueba experimental se obtuvieron dos resultados adicionales que confirman este desplazamiento caudal de la fermentación proteica debido al mayor flujo de almidón a intestino grueso. En primer lugar, se observaron diferencias entre tratamientos en la evolución del perfil de AGV a lo largo de los diferentes compartimentos intestinales. En concreto, la concentración de AGV ramificados, que son producto de la fermentación proteica, se desplazó caudalmente en el tratamiento de patata respecto al de maíz. En segundo lugar, el incremento en la excreción fecal de N observado a los 38 días en el tratamiento de patata respecto el tratamiento de maíz, se compensó completamente con una menor excreción de N urinario, permaneciendo la retención total de N similar para los dos tratamientos.

Los resultados anteriores son coincidentes con la disminución de la urea plasmática descrita en cerdos tras la administración de alimentos con altos contenidos en fibra (Malmlöf, 1987) o tras la infusión de almidón en el íleon (Mosenthin et al, 1992). Sin embargo, Heijnen y Beynen (1997) detectaron este “trasvase” de N de la orina a las heces con la administración de almidón retrogradado, aunque no con almidón resistente crudo de amilomaíz. Partiendo de la lógica anterior, estos resultados, probablemente se expliquen por el hecho de que el almidón retrogradado, de degradación más lenta, alcanza los compartimentos más distales del intestino grueso (Reid y Hillman, 1999), mientras que el amilomaíz, (almidón resistente tipo 2) es degradado fundamentalmente en ciego y colon proximal. En nuestra primera prueba experimental el almidón utilizado es crudo de patata, y por lo tanto resistente tipo 2 como el amilomaíz. Las diferencias descritas entre nuestros resultados y los de Heijnen y Beynen (1997) no se justifican por diferentes flujos de almidón a intestino grueso, ya que en su estudio el flujo de amilomaíz a ciego fue de 50g/d, mientras que en el nuestro el flujo de almidón de patata fue de 65g/d. Probablemente las diferencias estén asociadas a la diferente resistencia que pueden ofrecer los dos diferentes tipos de almidón a la hidrólisis por las enzimas bacterianas. En el caso del almidón de patata, la estructura del granulo de almidón, constituido por bloques de 400-500 nm que forman una barrera en su superficie (Gallant et al, 1992), puede limitar la penetración de bacterias (Cotta, 1988; Reid et al, 1996) dificultando su unión con el sustrato, lo cual es esencial para la acción de algunas bacterias amilolíticas (Reeves et al, 1996). En consecuencia, la estructura del granulo de almidón de patata, puede dificultar la degradación bacteriana, retrasándola hasta colon distal y recto. En cambio, el granulo de amilomaíz debe su resistencia a la falta de ramificaciones que evitan la acción de las enzimas desramificadoras endógenas y a la presencia de complejos

amilosa-lípidos (Tester et al, 2004), pero no existe una estructura que dificulte físicamente la penetración de las bacterias amilolíticas.

Por otro lado, tampoco se puede descartar que las diferencias estén asociadas a características propias del resto de la ración. En este sentido, Govers et al, (1999) demostró que el aporte de polisacáridos no amiláceos puede desplazar caudalmente la fermentación del almidón resistente. En la prueba de Heijnen y Beynen (1997), las dietas experimentales no contienen otros tipos de fibra que el almidón resistente, mientras que en nuestra primera prueba todas las dietas incluyen un 8% MF⁻¹ de salvado, lo cual podría explicar parcialmente la fermentación del almidón en compartimentos más distales. En nuestra tercera prueba experimental, si bien no se controló la excreción de N en orina, tras 97 días de prueba la excreción fecal de N seguía siendo cuantitativamente superior en el tratamiento de patata que el de maíz. Al igual que en la primera prueba esta excreción se asoció con un mayor contenido de bases púricas en heces.

La reducción de las emisiones de N urinario a partir de la manipulación de la dieta podría tener un impacto positivo a diferentes niveles: clínico y medioambiental. A nivel clínico la utilización de estas estrategias puede ayudar a reducir el esfuerzo de excreción de nitrógeno en pacientes con insuficiencia renal. A nivel medioambiental, y pensando fundamentalmente en la producción porcina es interesante reducir la excreción de N amoniacal, ya que son precisamente estas formas de N más lixiviables las más susceptibles de contaminar el agua y también el aire mediante su volatilización (Cahn et al, 1998; Sutton et al, 1999). Sin embargo, la introducción de almidones de baja digestibilidad tiene un coste económico, ya que reduce el aporte energético de la ración. Así pues, a nivel práctico el interés en la introducción de almidón resistente depende del resultado de un balance entre los criterios productivos y medioambientales.

8.4. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DIGESTIVA

Los resultados de las pruebas experimentales reflejan que existe un proceso de adaptación digestivo dirigido a conseguir el máximo aprovechamiento del alimento ingerido. En el caso del almidón resistente, la incapacidad de conseguir una mejor digestión de la ración en intestino delgado provoca una adaptación del tracto digestivo posterior con el fin de fermentar la mayor cantidad posible de sustrato. Desde un punto de vista dinámico, el grado de fermentación entre ileon y recto depende de dos

parámetros: (1) el ritmo de fermentación bacteriana, asociado a la selección de bacterias específicas de sustrato, y (2) el tiempo de permanencia de la digesta en tracto digestivo posterior.

Ambos mecanismos requieren de un tiempo de adaptación que será variable en función de la especie, y el tipo y cantidad de sustrato fermentable. En ratas, se ha demostrado que es necesario más de un mes para fermentar almidón retrogradado (Brungstaard et al, 1995) o almidón de guisante (Faulks et al, 1989). A su vez, Le Blay et al (1999) demostraron también en ratas que el patrón cecal de AGV variaba incluso después de 6 meses de adaptación, indicando que no se había alcanzado un equilibrio microbiano estable. En la primera y tercera prueba experimental, son necesarios respectivamente 38 y 45 días para conseguir alcanzar una digestibilidad fecal de la MO en el tratamiento de patata equivalente al de maíz a los 9 y 11 días, indicando que el proceso de adaptación digestiva es superior a un mes.

En ambas pruebas experimentales, tanto el peso como la longitud del intestino grueso fueron superiores para el tratamiento de patata que el de maíz. La hipertrofia del tracto digestivo posterior, en respuesta a la llegada de sustrato fermentable ya había sido descrita en estudios anteriores (Deminqué y Rémésy, 1982; Calvert et al, 1989; Mathers et al, 1997) y es probablemente una respuesta adaptativa para aprovechar la energía del almidón que no se ha digerido en intestino delgado. En este caso, la finalidad de esta hipertrofia estaría justificada por la necesidad de retener la digesta y la flora microbiana el tiempo suficiente como para que se pueda llevar a cabo la fermentación de la MO que llega al intestino grueso. En particular, Mathers et al, (1997) observaron en ratas un incremento del tiempo medio de tránsito ororectal de la digesta, aunque solo significativo en ciego, asociado a una hipertrofia de este compartimento digestivo. En nuestros estudios con cerdos la hipertrofia fue exclusivamente localizada en colon, como corresponde a su mayor importancia es esta especie, y por lo tanto sería lógico esperar que el incremento del TMR detectado sea consecuencia fundamentalmente de un incremento del tiempo de tránsito en el colon. Topping et al (1997) también detectó un incremento en el tamaño del colon en cerdos en crecimiento asociado a la administración de almidón resistente. Según estos estudios se puede indicar que existen diferencias entre especies en el lugar más afectado por la fermentación del almidón resistente, en rata predominantemente en ciego y en cerdo en colon. En el caso del hombre, en el que el tracto digestivo posterior es más próximo al cerdo, sería de esperar mayor respuesta del colon.

A parte de un mayor tiempo de contacto entre la digesta y la microbiota intestinal también se produce una adaptación de la flora bacteriana al sustrato. Tanto en la primera como en la tercera prueba, el perfil de AGV a lo largo del tracto digestivo posterior demuestra que la administración de almidón de patata incrementa la concentración y proporción molar de butirato en colon proximal y medio. Es conocido que la fermentación de almidón resistente produce elevadas concentraciones de butirato (Scheppach et al, 1988; Phillips et al, 1995; Silvester et al, 1995; Cummings et al, 1996; Fergusson et al, 2000; Martin et al, 2000; Henningsson et al, 2003). Sin embargo en nuestro tercer estudio la proporción de butirato en colon proximal fue un 80% superior en el tratamiento de patata respecto el de maíz, mientras que en la primera prueba fue superior solamente en un 40%. Si bien estos resultados podrían estar condicionados por la diferentes cantidad de FND existentes en las dos pruebas, coinciden con los obtenidos por Le Blay et al (1999), e indican que el proceso de adaptación de la flora bacteriana al sustrato requiere un periodo de tiempo más prolongado de 5 semanas. Además, los resultados de las dos pruebas indican que el incremento en la proporción de butirato no es paralelo a un incremento en la concentración total de AGV, sino al contrario. En la primera prueba, la concentración de AGV en colon proximal es de 222 $\mu\text{mol} / \text{g MF}$, mientras que en la tercera es de 100 $\mu\text{mol} / \text{g MF}$, lo que sugiere que la evolución de la fermentación entre las 5 y 14 semanas no responde a un incremento en la fermentación del almidón de patata, sino a una orientación de la actividad microbiana hacia la producción de butirato.

Este proceso de adaptación de la flora al sustrato puede ser resultado de una selección de poblaciones microbianas (Varel et al, 1987), o bien de la inducción de enzimas amilolíticos en la flora existente (Salyers y Leedle, 1983). En nuestras pruebas experimentales, el incremento en la capacidad fermentativa no parece resultado de una inducción enzimática, ya que en el caso concreto de las amilasas, la inducción se lleva a cabo tras pocas horas de la presencia de almidón como sustrato (Macfarlane et al, 1990). Además, la flora intestinal contiene de manera espontánea un elevado numero de bacterias con capacidad amilolítica (Macfarlane y Englyst, 1986), y por lo tanto la actividad amilolítica en intestino grueso es elevada (Englyst et al, 1987). Sin embargo, la estructura del almidón de patata puede haber dificultado la actividad de las bacterias amilolíticas, impidiendo su penetración (Reid et al, 1996). Mientras algunas bacterias, necesitan penetrar en el granulo de almidón y unirse al sustrato para su actividad (Reeves et al, 1996) otras presentan actividad amilolítica extracelular (Cotta, 1988). Los largos periodos de adaptación descritos en nuestras pruebas experimentales podrían responder a una selección de este segundo tipo de

bacterias amilolíticas en relación al primero. Algunos autores (Macfarlane y Macfarlane, 1993; Topping y Clifton, 2001) han sugerido que la administración crónica de almidón resistente promueve la aparición de algunas bacterias amilolíticas como son *Clostridium* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., o *Butyrivibrio* sp. Aunque las técnicas utilizadas en nuestros experimentos no permiten obtener información respecto a estas bacterias, el incremento en la proporción molar de butirato entre la primera y segunda prueba experimental parecen confirmar esta hipótesis, ya que la mayoría de estas bacterias amilolíticas son butirogénicas (Salys, 1995). Además, en nuestro segundo experimento los resultados obtenidos por t-RFLP indican que después de la ingestión del almidón de patata en el tracto posterior se alcanza un perfil filogenético homogéneo y específico, con un número de bandas superior al observado con el almidón de maíz. Aun así, no se observaron diferencias entre tratamientos en las poblaciones de enterobacterias, lactobacilos e incluso bacterias totales. Otros autores (Kleese et al, 1997), detectaron un incremento en el contenido cecal de dos especies de lactobacillus (*L. acidophilus* y *L. plantarum*) como consecuencia de la administración en ratas de almidón de patata durante un periodo de cinco meses. Las diferencias entre nuestros resultados y los de estos autores pueden ser debidos al diferente modelo animal utilizado, diferente lugar de muestreo e incluso a la PCR utilizada. Nuestra PCR cuantitativa es específica de género pero no de especie, de tal forma que no podemos descartar la posibilidad de que no existan diferencias en la cantidad total de lactobacilos, pero si en las especies descritas en el artículo de Kleese et al (1997).

En cuanto al recuento de bacterias totales, en nuestra tercera prueba no hemos observado diferencias entre tratamientos. Estos resultados indican que la dieta ha sido capaz de modificar la ecología de la microbiota intestinal, resultando en la aparición de patrones de bacterias más susceptibles de fermentar almidón (Topping y Clifton, 2001) sin modificar el total de bacterias que habitan el tracto digestivo posterior. El hecho de que no se haya observado un recuento de bacterias más elevados en el contenido fecal de los animales alimentados con almidón de patata parece entrar en contradicción con los resultados obtenidos con la concentración de bases púricas, ya que en el tratamiento de patata se observó un fuerte incremento entre colon proximal y recto, mientras que con el tratamiento de maíz se observó un claro descenso. La explicación a este resultado podría deberse a que las células que están en un fase de crecimiento rápido tienen varias veces la cantidad de RNA que tienen las mismas células en fase de reposo. Por este motivo, la mayor concentración de bases púricas detectadas en nuestros dos experimentos probablemente reflejan una mayor actividad

bacteriana en los compartimentos caudales del intestino grueso de los animales alimentados con almidón de patata, más que una mayor biomasa. De ser así, la concentración de bases púricas podría servir para monitorizar la actividad microbiana a lo largo del tracto digestivo y no tanto como un indicador de masa microbiana.

En la tercera prueba experimental, la concentración de bases púricas y por lo tanto la actividad microbiana, con el tratamiento de almidón de patata no describió una evolución descendiente entre colon y recto, sino que su concentración aumentó ligeramente. Posiblemente las diferencias observadas entre las 2 pruebas sean debidas a diferencias en el contenido de carbohidratos indigestibles entre las dietas experimentales. Aunque no se pueden comparar directamente, debido diferente periodo de adaptación y edad de los animales, en la primera prueba el contenido de fibra bruta era de 50 g/kg, mientras que en la segunda dieta el contenido de FND era de 190 g/kg. La degradación bacteriana de la fibra está limitada fundamentalmente por su estructura física (van Dokkum et al, 1983) y por este motivo su degradación se desplaza hasta los compartimentos intestinales más caudales.

8.5. CONSECUENCIAS DE LA FERMENTACIÓN DE ALMIDÓN RESISTENTE

En humanos se acepta que la fibra dietética tiene un impacto positivo sobre la salud intestinal debido a que incrementa la masa digestiva (Cummings et al, 1992). Este incremento permite revertir la constipación intestinal y acelerar el tránsito diluyendo las toxinas y carcinógenos, y disminuyendo el tiempo de contacto entre estos compuestos y la mucosa intestinal (Topping y Clifton, 2001). En cerdas, la incorporación de ingredientes fibrosos se ha asociado con un descenso en el contenido de MS en las heces con un menor riesgo de constipación digestiva (Tabeling et al, 2003). El incremento en la liberación y absorción de toxinas bacterianas como consecuencia de la constipación digestiva se ha asociado con el desarrollo de mastitis, nefritis y agalaxia en cerdas.

El almidón resistente debido a su elevada fermentación se le considera poco efectivo en el incremento de la masa fecal. Varios estudios en humanos han estimado el incremento de heces entre 1 y 1.7 g de MF por gramo de almidón resistente ingerido (Cummings et al, 1996; Noakes et al, 1996; Phillips et al, 1995). En el caso concreto de almidón de patata, Cummings et al, 1996 estimó un incremento de 1.6 g/g en humanos. Los valores obtenidos en nuestras pruebas son claramente inferiores a los descritos en la bibliografía. En la primera prueba experimental se detectó un

incremento de 0.8g/g tras 8 días de prueba que se redujo hasta 0.2 g/g a los 38 días. En la tercera prueba experimental, tras 97 días de prueba se obtuvo el mismo valor (0.2 g/g) que en la primera prueba a 38 días indicando que después de las 5 semanas los mecanismos adaptativos que se siguen produciendo ya no tienen impacto sobre la masa fecal. Las diferencias observadas entre nuestros estudios y los datos publicados pueden deberse a la mayor capacidad fermentativa del cerdo. Sin embargo, nuestras pruebas ponen en evidencia que el periodo de adaptación determina el impacto del almidón resistente sobre la masa fecal. En las pruebas en que se ha estudiado el efecto del almidón resistente sobre la masa fecal, el tiempo de adaptación utilizado ha sido de 2 (Cummings et al, 1996), 3 (Phillips et al, 1995) y 4 semanas (Noakes et al, 1996), respectivamente. Probablemente, en caso de haber utilizado periodos más prolongados, las estimaciones de la contribución del almidón resistente al incremento de las heces frescas hubieran sido inferiores y más representativas de la situación que se produciría en una ingestión habitual y prolongada de almidón resistente. Existen diversos estudios epidemiológicos que relacionan el consumo de almidón resistente con una reducción en la incidencia de patologías digestivas como el cáncer colorectal (Steinmetz y Potter, 1991; Thun et al, 1992; Giovannucci et al, 1992; Topping et al, 1993; Cassidy et al, 1994). Si el efecto del almidón resistente sobre la masa fecal y el incremento en el tránsito es prácticamente nulo otros mecanismos deben explicar la asociación descrita.

Uno de los posibles mecanismos, podría ser el de generar un tipo de fermentación en que se puede reducir la generación de metabolitos tóxicos como puede ser amoníaco (Lin y Vissek, 1991) o los ácidos biliares secundarios (van Munster et al, 1994). En la tercera prueba experimental se ha demostrado que el consumo de altas dosis de almidón resistente durante un largo periodo de tiempo conduce a la selección de una flora diferente en los compartimentos más distales del intestino grueso. El estudio de los productos de la fermentación indica que la flora seleccionada es amilolítica y no proteolítica, ya que se incrementa la producción de butirato y se reduce la de AGV ramificados. Además, en la primera prueba se demuestra que el tipo de fermentación seleccionado disminuye la excreción de nitrógeno por vía urinaria, probablemente debido a una disminución en la producción y absorción de amoníaco. Otros autores (Govers et al, 1999; Birket et al, 2000; Muir et al, 2004) han demostrado que la fermentación de almidón resistente disminuye la producción de amoníaco, así como otros compuestos nitrogenados (fenol, p-cresol) considerados nocivos para la mucosa intestinal (Bingham, 1988; Ramakrishna et al 1991) y relacionados con la aparición de cáncer colorectal (Vissek et al, 1978). La fermentación de almidón resistente también se

ha demostrado efectiva para evitar la formación de otros compuestos nocivos para la mucosa intestinal, como los ácidos biliares secundarios (van Munster et al, 1994; Hylla et al, 1998), que también se han relacionado con la aparición de neoplasia (Topping y Clifton, 2001). La disminución en la producción de estos metabolitos se ha relacionado con el descenso del pH en la luz intestinal debido a la aparición de AGV resultantes de la fermentación de almidón resistente, ya que a bajo pH se inhibe la conversión bacteriana de ácidos biliares primarios a secundarios (Nagengast et al, 1988; Grubben et al, 2001). Además, con un pH inferior a 6, los ácidos biliares están muy protonados de tal forma que no pueden ser absorbidos por los colonocitos (Rafter et al, 1986). En nuestra tercera prueba experimental, al igual que en otros estudios (Topping y Clifton, 2001) se registró un descenso del pH relacionado con la producción de AGV.

Otro de los posibles mecanismos que podrían explicar los efectos locales a nivel intestinal relacionados con la ingestión de almidón resistente, podría ser la generación de metabolitos esenciales para el mantenimiento de la salud de la mucosa intestinal como puede ser el butirato (Muir et al, 2004). El butirato es el principal sustrato energético de los colonocitos (Roediger, 1980; Luciano et al, 2002) de tal forma que resulta esencial para el mantenimiento de la estructura intestinal normal (Kripke et al, 1989). Su ausencia puede dar lugar a colitis ulcerativas (Roediger, 1986; Vernia et al, 1988) e incrementa el riesgo de cáncer colorectal (Bingham, 1990) debido a su papel en la cinética de la mucosa intestinal. La presencia de butirato promueve la proliferación celular en la base de las criptas y la reduce en las porciones más superficiales (Topping y Clifton, 2001), en donde se pueden producir mutaciones espontáneas debido a la presencia de compuestos nocivos como los ácidos biliares secundarios (Lapre y van der Meer, 1992). Además, la energía que aporta el butirato es esencial para el mantenimiento de las membranas mitocondriales de los colonocitos, de tal forma que la presencia de butirato evita la liberación de factores inductores de la apoptosis como el citocromo C (Brunner et al, 1997). En nuestra tercera prueba experimental, hemos detectado una disminución de la apoptosis en colon proximal en relación con la mayor concentración de butirato en la digesta. Sin embargo tanto en la primera como en la tercera prueba experimental hemos registrado una disminución del grosor de la mucosa y de la profundidad de las criptas en colon proximal. Si consideramos que la situación es similar a la de las vellosidades intestinales en el que la longitud responde a un balance entre la proliferación, la muerte celular y la descamación (Pluske et al, 1997), deberíamos esperar que una disminución en la apoptosis o muerte celular se tradujera en un incremento en la longitud de las criptas, y en cambio observamos el efecto contrario. Estos resultados

sugieren que en el tratamiento de maíz la proliferación de las criptas esta aumentada en relación al tratamiento de patata. Se considera que los incrementos en la proliferación epitelial son respuestas inespecíficas al daño celular provocado por compuestos citotóxicos (Lapre et al, 1993; Govers et al, 1993) como pueden ser los productos de la fermentación proteica o los ácidos biliares secundarios. Esta hipótesis podría estar avalada por el incremento en la excreción fecal de magnesio observado en el tercer ensayo en los cerdos alimentados con almidón de maíz, frente a los cerdos alimentados con almidón de patata. Debido a que las células epiteliales contienen grandes cantidades de magnesio, el incremento en la excreción fecal de magnesio podría ser indicativo de mayor citotoxicidad de la digesta (Govers et al, 1993). Sin embargo, el incremento en la digestibilidad del magnesio también podría ser consecuencia de un incremento en la absorción de este mineral. La hipertrofia del intestino grueso observada en las dos pruebas experimentales podría incrementar la absorción de minerales como el magnesio y el calcio, tal y como demostró Younes et al (1996; 2001) en ratas alimentadas con almidón resistente. Además, la reducción del pH observada en relación a la producción de AGV, podría incrementar la solubilidad de estos minerales mejorando su disponibilidad (Delzenne et al, 1995). Estos resultados contrastan con la digestibilidad del calcio que disminuyó hasta alcanzar valores inferiores en el tratamiento de patata respecto el de maíz ($P < 0.05$). En otras pruebas publicadas (Lopez et al, 1998; Bird et al, 2000) se ha observado el efecto contrario: un incremento en la digestibilidad del calcio tras la administración de almidón resistente. Las diferencias de resultados entre pruebas podrían ser consecuencia de la interacción con otros componentes de la dieta, especialmente con aquellos que tienen un alto contenido en fibra. Diversos estudios (Behall et al, 1987; Spencer et al, 1991; Coudray et al, 2003) han asociado negativamente la absorción de calcio y otros minerales con el contenido de fibra en la dieta.

En su conjunto, las pruebas experimentales demuestran que tras un periodo de adaptación, el cerdo tiene capacidad de poner en marcha diferentes mecanismos para incrementar el aprovechamiento energético del almidón en el tracto digestivo. Estos mecanismos, afectan tanto al tracto digestivo como a su microbiota, y tienen como consecuencia la producción de algunos metabolitos potencialmente beneficiosos como el butirato, y la supresión de metabolitos citotóxicos como los derivados de la fermentación proteica o los ácidos biliares secundarios, por lo que pueden tener cierto impacto sobre parámetros relacionados con la salud intestinal.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en la presente tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La incorporación en la ración del cerdo en crecimiento de cantidades apreciables de almidón resistente (en forma de almidón crudo de patata) provoca un descenso significativo en la digestibilidad de la materia orgánica, debido a la mayor excreción en las heces de la fibra neutro detergente y la proteína. Las diferencias se observan fundamentalmente en las primeras semanas de adaptación y posteriormente decrecen.
2. La mayor excreción de proteína en las heces de los animales alimentados con almidón de patata se asocia con una mayor excreción de material microbiano, y con un descenso en la excreción de nitrógeno urinario.
3. La adaptación digestiva del cerdo en crecimiento al consumo de mayores cantidades de almidón resistente incorpora diferentes estrategias como son: un mayor desarrollo de los compartimentos de fermentación, fundamentalmente del colon, y la diferenciación de la población microbiana responsable de dicha fermentación.
4. Como productos resultantes del incremento de la fermentación de almidón resistente en el cerdo se observa un incremento en la concentración y absorción de los AGV, un incremento en la proporción de butirato, y un descenso del pH digestivo posterior y de la citotoxicidad de la digesta.
5. La incorporación de carbohidratos resistentes pero fermentables en sustitución de almidón fácilmente digestible en intestino delgado, determina un descenso en las actividades enzimáticas de síntesis de grasa y en el depósito de grasa, lo que confirma la menor eficiencia energética del proceso de fermentación.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFIA

- Anderson GH, Catherine NL, Woodend DM y Wolever TM (2002) Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men. *Am J Clin Nutr*, 76(5):1023-1030.
- Anguita M, Gasa J, Martín-Orúe SM y Pérez JF (2006a) Study of the Effect of Technological Processes on Starch Hydrolysis, Non-Starch Polysaccharides Solubilization and Physicochemical Properties of Different Ingredients Using a Two-Step In Vitro System. *Animal Feed Science and Technology* (aceptado).
- Anguita M, Gasa J, Martín-Orúe SM y Pérez JF (2006b) Effect of coarse grinding, sugar beet pulp or wheat bran on feed intake and energy utilization in growing pigs from 15 to 45 Kg of weight. *Journal of Animal Science* (enviado).
- Annison G y Topping DL (1994) Nutritional role of resistant starch: Chemical structure vs physiological function. *Annu Rev Nutr*, 14 : 297-320.
- Aumaitre A y Corring T (1978) Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. II. Intestine and intestinal disaccharidases. *Nutr Metab*, 22(4): 244-255.
- Argenzio RA y Southworth M (1975) Sites of organic acid production and absorption in the gastrointestinal tract of the pig. *Am J Physiol*, 228: 454-464.
- Asp NG (1992) Resistant starch. Proceedings from the secondary plenary meeting of EURESTA: European Preface. *Eur J Clin Nutr*, 4: (suppl 2) S1.
- Asp NG, Tovar J y Bairoliya S (1992) Determination of resistant starch in vitro with three different methods, and in vivo with a rat model. *Eur J Clin Nutr*, 46 Suppl 2:S117-119.
- Bach Knudsen KE (1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 67: 319-338.
- Bach Knudsen KE y Jørgensen H (2001) Intestinal degradation of dietary carbohydrates- from birth to maturity. En: *Proceedings of the 8th symposium The digestive Physiology of Pigs*. Eds: JE Lindberg y B Ogle. CABI international, Sweden.

- Bach Knudsen KE, Jensen BB y Hansen I (1993) Oat bran but not α -glucan-enriched oat fraction enhances butyrate production in the large intestine of pigs. *Journal of Nutrition*, 123: 1235-1247.
- Bach Knudsen KE, Jorgensen H, Canibe N (2000) Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *Br J Nutr*, 84(4): 449-458.
- Bach Knudsen KE, Jensen BB, Andersen JO y Hansen I (1991) Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract. *Br J Nutr*, 65(2): 233-248.
- Baidoo SK, Liu YG y Yungblut D (1998) Effect of microbial enzyme supplementation on energy, amino acid digestibility and performance of pigs fed hull-less barley based diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 78: 625-631.
- Behall KM y Hallfrisch J (2002) Plasma glucose and insulin reduction after consumption of breads varying in amylose content. *Eur J Clin Nutr*, 56(9): 913-920.
- Behall KM, Scholfield DJ, Lee K, Powell AS y Moser PB (1987) Mineral balance in adult men: effect of four refined fibers. *Am J Clin Nutr*, 46(2): 307-314.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70: 567-590.
- Berry C (1986) Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *J Cereal Sci*, 4: 301-314.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70: 567-590.
- Bettge AD, Giroux MJ y Morris CF (2000) Susceptibility of waxy starch granules to mechanical damage. *Cereal Chemistry*, 77: 750-753.

- Bingham SA (1990) Mechanism and experimental epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proc Nutr Soc*, 49: 153-171.
- Bingham SA (1988) Meat, starch, and nonstarch polysaccharides and large bowel cancer. *Am J Clin Nutr*, 48(3 Suppl): 762-767.
- Bird AR, Hayawaka T, Marsono Y, Gooden JM, Record IA, Correll RL y Topping DL (2000) Coarse brown rice increases fecal and large bowel short-chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. *J Nutr* 130: 1780-1787.
- Birkett AM, Mathers JC, Jones GP, Walker KZ, Roth MJ y Muir JG (2000) Changes to the quantity and processing of starchy foods in a western diet can increase polysaccharides escaping digestion and improve in vitro fermentation variables. *Br J Nutr*, 84(1): 63-72.
- Björck I (1996) Starch: nutritional aspects. En: *Carbohydrates in food*. Eliasson AC. Ed: Marcel Dekker, New York, EEUU, pp: 505-554.
- Brink EJ, Van den Berg GJ, Van der Meer R, Wolterbeek HT, Dekker PR y Beynen AC (1992) Inhibitory effect of soybean protein vs. casein on apparent absorption of magnesium in rats is due to greater excretion of endogenous magnesium. *J Nutr*, 122(9): 1910-1916.
- Brown IL, McNaught KJ y Moloney E (1985) Hi-maizeTM : new directions in starch technology and nutrition. *Food Aust* 47: 272-275.
- Brown I, Warhurst M, Arcot J, Playne M, Illman RJ y Topping DL (1997) Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose cornstarch than with a low amylose cornstarch. *J Nutr*, 127(9): 1822-1827.
- Brown I, Conway P y Topping D (2000) The health potential of resistant starches in foods. An Australian perspective. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 44(2): 53-58.
- Brown I, Wang X y Topping D (1998) High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia*, 47: 272-275.

- Brunner S, Kramar K, Denhardt DT y Hofbauer R (1997) Cloning and characterization of murine carnitine acetyltransferase: evidence for a requirement during cell cycle progression. *Biochem J*, 322 (Pt 2):403-410.
- Brunsgaard G, Bach Knudsen KE y Eggum BO (1995) The influence of the period of adaptation on the digestibility of diets containing different types of indigestible polysaccharides in rats. *Br J Nutr*, 74(6): 833-848.
- Cahn TT, Sutton AL, Aarnink AJA, Verstegen MWA, Schrama JW y Bakker GCM (1998) Dietary carbohydrates alter fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pigs. *J Anim Sci*, 76: 1887-1895.
- Calvert RJ, Otsuda M y Satchithanandam S (1989) Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. *Journal of Nutrition*, 199:1610-1616.
- Cassidy A, Bingham SA y Cummings JH (1994) Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer*, 69(5): 937-942.
- Casterline JL, Oles CJ y Ku Y (1997) In vitro fermentation of various food fiber fractions. *J Agric Food Chem*, 45: 2463-2467.
- Champ MM (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46 Suppl 1: s51-s61.
- Champ MM (2004) Physiological aspects of resistant starch and in vivo measurements. *J AOAC Int*, 87(3): 749-755.
- Chen WJ, Anderson JW y Jennings D (1984) Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 175(2): 215-218.
- Cheng HH y Lai MH (2000) Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *J Nutr*, 130(8): 1991-1995.

- Chesson A, Richardson AJ y Robertson JA (1985) Fibre digestion and bacteriology of the digestive tract of pigs fed cereal and vegetable fibre. En: Digestive Physiology in the Pig. Eds: Just A, Jorgensen H y Fernandez JA. National Institute of Animal Science, Copenhagen, Denmark. pp: 272-275.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC y Lombardo YB (2003) Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr*, 133(1): 127-133.
- Chiotelli E y Le Meste M (2002) Effect of small and large wheat starch granules on thermomechanical behaviour of starch. *Cereal Chem*, 79: 286-293.
- Classen HL y Bedford MR (1991) The use of enzyme to improve the nutritive value of poultry feeds. En: Recent Advances in Animal Nutrition 1991. Eds: Haresign W y Cole DJA. Butterworth, London, pp: 95-116.
- Claus R, Losel D, Lacorn M, Mentschel J y Schenkel H (2003) Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation. *J Anim Sci*, 81(1): 239-248.
- Colonna P, Leloup V y Buleon A (1992) Limiting factors of starch hydrolysis. *Eur J Clin Nutr*, 46 (Suppl 2): S17-S32.
- Colonna P y Mercier C (1985) Gelatinization and melting of maize and pea starches with normal and high-amylose genotypes. *Phytochemistry*, 24: 1667-1674.
- Colonna P, Tayeb J y Mecier C (1989) Extrusion cooking of starch and starchy products. En: Extrusion cooking. Eds: Mercier C, Linko P y Harper JM. American Association of Cereal Chemists, Minnessota, USA, pp: 247-319.
- Corring T, Aumaitre A y Durand G (1978) Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. I. Pancreas and pancreatic enzymes. *Nutr Metab*, 22(4): 231-243.
- Cotta MA (1988) Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 54(3): 772-776.

- Coudray C, Demigne C y Rayssiguier Y (2003) Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. *J Nutr*, 133(1): 1-4.
- Cramer KR, Wilson KJ, Moritz JS y Beyer RS (2003) Effect of sorghum-based diets subjected to various manufacturing procedures on broiler performance. *J Appl Poult Res*, 12: 404-410.
- Cummings JH y Macfarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*, 70(6): 443-459.
- Cummings JH (1997) *The Large Intestine in Nutrition and Disease*. Brussels: Institute Danone.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP y MacFarlane GT (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28: 1221-1227.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA y Englyst HN (1996) Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr*, 75(5): 733-747.
- Cummings JH, Bingham SA, Heaton KW y Eastwood MA (1992) Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber) *Gastroenterology*, 103(6): 1783-1789.
- de Deckere EA, Kloots WJ y van Amelsvoort JM (1993) Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. *J Nutr*, 123(12): 2142-2151.
- de Deckere EA, Kloots WJ y van Amelsvoort JM (1995) Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. *Br J Nutr*, 73(2): 287-298.
- Demingué C y Rémésy C (1982) Influence of unrefined potato starch on caecal fermentation and volatile fatty acid absorption in rats. *J Nutr*, 112(2): 2227-2234.

- Delzenne N, Aertssens J, Verplaetse H, Rocco M y Roberfroid M (1995) Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Sci*, 57(17):1579-1587.
- Doorenbos J, Rijnen M, Van Laar H y Flores Miñambres A (2004) Valoración nutritiva de materias primas en los países bajos. XX Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Eds: Rebollar PG, de Blas C y Mateos GG. Fira de Barcelona, España. pp: 27-48.
- Durand M y Bernalier A (1995) Reductive acetogenesis in animal and human gut. En: *Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids*. Eds: Cummings JH, Rombeau JL y Sakata T. Cambridge Univ Press. Cambridge, UK. pp: 107.
- Ebihara K, Shiraishi R y Okuma K (1998) Hydroxypropyl-modified potato starch increases fecal bile acid excretion in rats. *J Nutr*, 128(5): 848-854.
- Edwards CA y Parrett AM (1996) Plant cell wall polysaccharides, gums, and hydrocolloids: nutritional aspects. En: *Carbohydrates in food*. Ed: AC Eliasson. Marcel Dekker, New York, EEUU, pp: 319-346.
- Elsden SR, Hitchcock MWS, Marshall RA y Phillipson AT (1946) Volatile acid in the digesta of ruminants and other animals. *J Exp Biol*, 22: 191-202.
- Englyst HN, Kingman SM, y Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr*, 46(S2): S33-S50.
- Englyst HN, Veenstra J y Hudson GJ (1996) Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential in vitro predictor of the glycaemic response. *British Journal of Nutrition*, 75: 327-337.
- Englyst HN y Cummings JH (1987) Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am J Clin Nutr*, 45(2): 423-431.
- Englyst HN, Hay S y Macfarlane GT (1987b) Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology and Ecology*, 95: 163-171.

- Faisant N, Buleon A, Colonna P, Molis C, Lartigue S, Galmiche JP y Champ M (1995) Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *Br J Nutr*, 73(1): 111-123.
- FAO (1998) Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome, 14-18 April 1997.
- Faulks RM, Southon S y Livesey G (1989) Utilization of alpha-amylase (EC 3.2.1.1) resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. *Br J Nutr*, 61(2): 291-300.
- Fengler AI y Marquardt RR (1988) Water soluble pentosans from rye. II. Effects of rate of dialysis on the retention of nutrients by the chick. *Cereal Chemistry*, 65: 298-302.
- Ferguson MJ y Jones GP (2000) Production of short-chain fatty acids following in vitro fermentation of saccharides, saccharide esters, fructo-oligosaccharides, starches, modified starches and non-starch polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 166-170.
- Fleming SE, O'Donnell AU y Pearman JA (1985) Influence of frequent and long-term bean consumption and colonic function and fermentation. *Am J Clin Nutr*, 41: 909-918.
- Fleming SE, Fitch MD y Chansler MW (1989) High-fiber diets: influence on characteristics of cecal digesta including short-chain fatty acid concentrations and pH. *Am J Clin Nutr*, 50(1): 93-99.
- Fleming SE, Choi SY y Fitch MD (1991) Absorption of short-chain fatty acids from the rat cecum in vivo. *J Nutr*, 121(11): 1787-1797.
- French D (1984) Organization of starch granules. En *Starch: Chemistry and Technology*. Ed: RL Whistler, JN Bemiller y EF Pashall. New York: Academic. pp 183-245.

- Frommel TO, Mobarhan S, Doria M, Halline AG, Luk GD, Bowen PE, Candel A y Liao Y (1995) Effect of beta-carotene supplementation on indices of colonic cell proliferation. *J Natl Cancer Inst*, 87(23): 1781-1787.
- Hizukuri S (1996) Starch: analitical aspects. En: *Carbohydrates in food*. Ed: Eliasson AC. Marcel Dekker, New York, EEUU, pp: 347-429.
- Gallant DJ, Bouchet B, Buleon A y Perez S (1992) Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur J Clin Nutr*, 46 (Suppl.2):S3-S16.
- Gernat C, Rodosta S, Damaschun G, Schierbaum F (1990) Supramolecular structure of legume starches revealed by X-ray scattering. *Starch/Starke*, 42 : 175-178.
- Gibson GR y Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125(6): 1401-1412.
- Gibson SA, Macfarlan C, Hay S y Macfarlane GT (1989) Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 679-683.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz G, Rimm EB y Willett WC (1992) Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in men. *J Natl Cancer Inst*, 84(2): 91-98.
- Girard J, Ferre P y Foufelle F (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr*, 17: 325-52.
- Giusi-Perier A, Fiszlewicz M y Rerat A (1989) Influence of diet composition on intestinal volatile fatty acid and nutrient absorption in unanesthetized pigs. *J Anim Sci*, 67(2): 386-402.
- Glitsø LV, Brunsgaard G, Højsgaard S, Sandström B y Bach Knudsen KE (1998) Intestinal degradation in pigs of rye dietary fibre with different structural characteristics. *British Journal of Nutrition*, 80: 457-468.
- Goodlad JS y Mathers JC (1990) Large bowel fermentation in rats given diets containing raw peas (*Pisum sativum*). *British Journal of Nutrition*, 64: 569-587.

- Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR y Muir JG (1999) Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut*, 45(6): 840-847.
- Govers MJ, Lapre JA, De Vries HT y Van der Meer R (1993) Dietary soybean protein compared with casein damages colonic epithelium and stimulates colonic epithelial proliferation in rats. *J Nutr*, 123(10): 1709-1713.
- Graham, H y Aman P (1986) The pig as a model in dietary fiber digestion studies. *Scand J Gastroenterol* 22: 55-61.
- Graham H, Fadel JG, Newman CW y Newman PK (1989) Effect of pelleting and β -glucanase supplementation on the ileal and fecal digestibility of a barley-based diet in the pig. *J Anim Sci*, 67: 1293-1298.
- Granfeldt YE, Drews AW y Bjorck IME (1993) Starch bioavailability in arepas made from ordinary or high amylose corn: concentration and gastrointestinal fate of resistant starch in rats. *Journal of Nutrition*, 123: 1676-1684.
- Grosjean F, Bastianelli D, Bourdillon A, Cerneau P, Jondreville C y Peyronnet C (1998) Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.). 2. Nutritional value in the pig. *Animal Science*, 67: 621-625.
- Grubben MJ, van den Braak CC, Essenberg M, Olthof M, Tangerman A, Katan MB y Nagengast FM. Effect of resistant starch on potential biomarkers for colonic cancer risk in patients with colonic adenomas: a controlled trial. *Dig Dis Sci*, 46(4): 750-756.
- Gudmundsson M, Eliasson AC, Bengtson S y Aman P (1991) The effects of water soluble arabinoxylan on gelatinization and retrogradation of starch. *Starch/Starke*, 43: 5-10.
- Guillou D y Landeau E (2000) Granulométrie et nutrition porcine. *INRA Prod Anim*, 13(2): 137-145.

- Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D y Paraskeva C (1993) Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, 55(3): 498-505.
- Hague A, Elder DJ, Hicks DJ y Paraskeva C (1995) Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer*, 60(3): 400-406.
- Hahn DH, Rooney LW y Earp CF (1984) Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Foods World*, 29: 776.
- Hampson DJ, Robertson ID, La T, Oxberry SL y Pethick DW (2000) Influences of diet and vaccination on colonisation of pigs by the intestinal spirochaete *Brachyspira* (Serpulina) *pilosicoli*. *Vet Microbiol*, 73(1): 75-84.
- Hardwick LL, Jones MR, Buddington RK, Clemens RA, Lee DB. Comparison of calcium and magnesium absorption: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol*, 259(5 Pt 1):G720-G726.
- Heijnen MLA y Beynen AC (1997) Consumption of retrograded (RS3) but not uncooked (RS2) resistant starch shifts nitrogen excretion from urine to feces in cannulated piglets. *J. Nutr*, 127: 1828-1832.
- Henningsson AM, Margareta E, Nyman GL y Bjorck IM (2003) Influences of dietary adaptation and source of resistant starch on short-chain fatty acids in the hindgut of rats. *Br J Nutr*, 89(3): 319-328.
- Higgins JA (2004) Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *J AOAC Int*, 87(3): 761-768.
- Higgins JA, Higbee DR, Donahoo WT, Brown IL, Bell ML y Bessesen DH (2004) Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutr Metab (Lond)*, 6;1(1):8.
- Hill MJ (1995) Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *Eur J Cancer Prev*, 4(5): 353-358.

- Holm J, Björck I, Ostrowska S, Eliasson AC y Asp NG (1983) Digestibility of amylose lipid complexes in vitro and in vivo. *Starch/Starke*, 35: 294-297.
- Holm J, Björck I, Eliasson AC y Asp NG (1986) A rapid method for the analysis of starch. *Starch/Starke*, 38: 224-226.
- Holtug K, Clausen MR, Hove H, Christiansen J y Mortensen PB (1992) The colon in carbohydrate malabsorption: short-chain fatty acids, pH, and osmotic diarrhoea. *Scand J Gastroenterol*, 27(7): 545-552.
- Hopwood DE, Pethick DW, Pluske JR y Hampson DJ (2004) Addition of pearl barley to a rice-based diet for newly weaned piglets increases the viscosity of the intestinal contents, reduces starch digestibility and exacerbates post-weaning colibacillosis. *Br J Nutr*, 92(3): 419-427.
- Hylla S, Gostner A, Dusel G, Anger H, Bartram HP, Christl SU, Kasper H y Scheppach W (1998) Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. *Am J Clin Nutr*, 67(1): 136-142.
- Jenkins DJA, Wolever TMS, Taylor RH, Ghafari H, Barker HM, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL y Goff DV (1981) A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*, 34: 362-366.
- Jenkins DJ, Vuksan V, Kendall CW, Wursch P, Jeffcoat R, Waring S, Mehling CC, Vidgen E, Augustin LS y Wong E (1998) Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr*, 17(6):609-616.
- Jensen BB (2001) Possible ways of modifying type and amounts of products from microbial fermentation in the gut. En: *Gut environment of pigs*. Eds: Piva A, Bach Knudsen KE y Lindberg JE). Nottingham University Press, UK. pp: 181-200.
- Jing-ming L y Sen-lin Z (1990) Scanning electron microscopy study on gelatinization of starch granules in excess water. *Starch/Starke*, 42: 362-366.

- Jouppila K, Kansikas J y Roos YH (1998) Factors affecting crystallisation and crystallisation kinetics in amorphous corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 36: 143-149.
- Kabir M, Rizkalla SW, Champ M, Luo J, Boillot J, Bruzzo F y Slama G (1998) Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr*, 128(1): 35-43.
- Kelly D, Smyth JA y McCracken KJ (1991a) Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Br J Nutr*, 65(2): 169-180.
- Kelly D, Smyth JA y McCracken KJ (1991b) Digestive development of the early-weaned pig. 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *Br J Nutr*, 65(2): 181-188.
- Key FB y Mathers JC (1993) Gastrointestinal responses of rats fed on white and wholemeal breads: complex carbohydrate digestibility and the influence of dietary fat content. *Br J Nutr*, 69(2): 481-495.
- Keys JE y DeBarthe JV (1974) Cellulose and hemicellulose digestibility in the stomach, small intestine and large intestine of swine. *Journal of Animal Science*, 39: 53-56.
- Kidder DE y Manners MJ (1980) The level and distribution of carbohydrates in the small intestine mucosa of pigs from 3 weeks of age to maturity. *Br J Nutr*, 43(1): 141-153.
- Kishida T, Nogami H, Himeno S y Ebihara K (2001) Heat moisture treatment of high amylose cornstarch increases its resistant starch content but not its physiologic effects in rats. *J Nutr*, 131(10): 2716-2721.
- Kleessen B, Stoof G, Proll J, Schmiedl D, Noack J y Blaut M (1997) Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. *J Anim Sci*, 75(9): 2453-2462.

- Kohyama K y Nishina K (1991) Effect of soluble sugars on gelatinization and retrogradation of sweet potato starch. *J Agric Chem*, 39: 1406-1410.
- Kotara D y Fuchs B (2001) The effect of gelatinization degree and source of starch on the ileal and faecal digestibility of nutrients and growth performance of early-weaned piglets. *J Anim Feed Sci*, 10 (suppl 2): 163-170.
- Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG y Rombeau JL (1989) Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 13(2): 109-116.
- Kritchevsky D (1995) Epidemiology of fibre, resistant starch and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev*, 4(5):345-52.
- Kritchevsky D (1988) Dietary fiber. *Annu Rev Nutr*, 8: 301-328.
- Langkilde AM, Champ M y Andersson H (2002) Effects of high-resistant-starch banana flour (RS(2)) on in vitro fermentation and the small-bowel excretion of energy, nutrients, and sterols: an ileostomy study. *Am J Clin Nutr*, 75(1):104-111.
- Lapre JA y van der Meer R (1992) Diet-induced increase of colonic bile acids stimulates lytic activity of fecal water and proliferation of colonic cells. *Carcinogenesis*, 13(1): 41-44.
- Lapre JA, De Vries HT, Koeman JH y Van der Meer R (1993) The antiproliferative effect of dietary calcium on colonic epithelium is mediated by luminal surfactants and dependent on the type of dietary fat. *Cancer Res*, 53(4): 784-789.
- Lauro M, Forssell PM, Suortti MT, Hulleman, SHD y Poutenen KS (1999) Alpha-amylolysis of large barley starch granules, *Cereal Chemistry*, 76: 925-930.
- Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C (1999) Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr* 82: 419-426.
- Lehmann U, Jacobasch G y Schmiedl D (2002) Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *J Agric Food Chem*, 50 (18):5236-5240.

- Lerer-Metzger M, Rizkalla SW, Luo J, Champ M, Kabir M, Bruzzo F, Bornet F y Slama G (1996) Effects of long-term low-glycaemic index starchy food on plasma glucose and lipid concentrations and adipose tissue cellularity in normal and diabetic rats. *Br J Nutr*, 75(5): 723-732.
- Lewis SJ y Heaton KW (1997) The intestinal effects of bran-like plastic particles: is the concept of 'roughage' valid after all? *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 9(6): 553-557.
- Lii C, Lai VMF y Shen MC (2004) Changes in retrogradation properties of rice starches with amylose content and molecular properties. *Cereal Chem*, 81:392-398.
- Liljeberg H y Bjorck I (1994) Bioavailability of starch in bread products. Postprandial glucose and insulin responses in healthy subjects and in vitro resistant starch content. *Eur J Clin Nutr*, 48(3):151-163.
- Liljeberg H, Granfeldt Y y Bjorck I (1992) Metabolic responses to starch in bread containing intact kernels versus milled flour. *Eur J Clin Nutr*, 46(8):561-575.
- Lin HC y Visek WJ (1991) Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J Nutr*, 121(6): 887-893.
- Liu YF, Fadden K, Latymer E, Low AG y Hill MJ (1985) The use of the cannulated pig to study the effect of dietary fibre supplements on the bacterial flora of the porcine hindgut. En: *Digestive Physiology in the Pig*. Eds: Just A, Jorgensen H y Fernandez JA National Institute of Animal Science, Copenhagen, Denmark. pp: 300-303.
- Livesey G (1990) Energy values of unavailable carbohydrate and diets: an inquiry and analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51: 617-637.
- Livesey G, Wilkinson JA, Roe M, Faulks R, Clark S, Brown JC, Kennedy H y Elia M (1995) Influence of the physical form of barley grain on the digestion of its starch in the human small intestine and implications for health. *Am J Clin Nutr*, 61(1): 75-81.

- Lizardo R, Peiniau J y Aumaitre A (1995) Effect of sorghum on performance, digestibility of dietary components and activities of pancreatic and intestinal enzymes in the weaned piglet. *Animal Feed Science and Technology*, 56: 67-82.
- Ljøkjel K, Sørensen M, Storebakken y Skrede A (2004) Digestibility of protein, amino acids and starch in mink (*Mustela vison*) fed diets processed by different extrusion conditions. *Can J Anim Sci*, 84: 673-680.
- Longland AC, Low AG, Quelch DB y Bray SP (1993) Adaptation to the digestion of non-starch polysaccharide in growing pigs fed on cereal or semi-purified basal diets. *Br J Nutr*, 70(2): 557-566.
- Lopez HW, Levrat-Verny MA, Coudray C, Besson C, Krespine V, Messenger A, Demigne C y Remesy C (2001) Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *J Nutr*, 131(4): 1283-1289.
- Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Younes H, Demigne C y Remesy C (1998) Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J Nutr*, 128(7): 1192-1198.
- Low AG y Longland AC (1990) Carbohydrate and dietary fibre digestion in the pig and the possible influence of feed enzymes. *Feed-Compounder*, 10: 37-42.
- Low AG (1993) Role of dietary fibre in pig diets. En: *Recent developments in pig nutrition 2*. Eds: Cole y Haresign. Gransworthy, pp: 137-162.
- Lu Z, Collier G y Muir J (1995) Comparison of Resistant Starch with Soluble and Insoluble Non-Starch Polysaccharides on Faecal Output. *Conference of Nutrition Society of Australia*. The Nutrition Society of Australia, Melbourne. pp:41.
- Luciano L, Groos S, Busche R, Von Engelhardt W y Reale E (2002) Massive apoptosis of colonocytes induced by butyrate deprivation overloads resident macrophages and promotes the recruitment of circulating monocytes. *Cell Tissue Res*, 309(3): 393-407.
- Macfarlane GT, Gibson GR y Cummings JH (1992) Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol*, 72(1): 57-64.

- Macfarlane GT, Hay S, Macfarlane S y Gibson GR (1990) Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glycosidase production by *Bacteroides ovatus*, in batch and continuous culture. *J Appl Bacteriol*, 68(2): 179-187.
- Macfarlane GC, Cummings JH y Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology*, 132: 1647-1656.
- Macfarlane GT, Allison C, Gibson SA y Cummings JH (1988) Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J Appl Bacteriol*, 64(1): 37-46.
- Macfarlane GT y Englyst HN (1986) Starch utilization by the human large intestinal microflora. *J Appl Bacteriol*, 60(3): 195-201.
- Macfarlane GT y Macfarlane S (1993) Factors affecting fermentation reactions in the large bowel. *Proc Nutr Soc*, 52(2): 367-373.
- Malmlöf K (1987) Porto-arterial plasma concentration difference of urea and ammonia-nitrogen in growing pigs given high-fibre and low-fibre diets. *Br J Nutr*, 57: 439-446.
- Mathers JC (1991) Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. *Proc Nutr Soc*, 50(2):161-172.
- Mathers JC, Smith H y Carter S (1997) Dose-response effects of raw potato starch on small intestinal escape, large-bowel fermentation and gut transit time in the rat. *British Journal of Nutrition*, 78: 1015-1029.
- Marsono Y, Illman RJ, Clarke JM, Trimble RP y Topping DL (1993). Plasma lipids and large bowel volatile fatty acids in pigs fed white rice, brown rice and rice bran. *Br J Nutr*, 70: 503-513.
- Marsono Y (1995) Complex Carbohydrates and Lipids in Rice Products: Effects on Large Bowel Volatile Fatty Acids and Plasma Cholesterol in Animals (PhD thesis). Bedford Park: Flinders Univ. of South Australia.

- Martin L, Dumon H y Champ M (1998) Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model. *J Sci Food Agri*, 77: 71-81.
- Martin LJ, Dumon HJ, Lecannu G y Champ MM (2000) Potato and high-amylose maize starches are not equivalent producers of butyrate for the colonic mucosa. *Br J Nutr*, 84(5): 689-696.
- May TR, Mackie RI y Fahey GC JR (1993) Fiber digestion in the hinfgut of Chinese and domestic pigs (Abstract). *FASEB J*, 7: A740.
- McCleary BV y Monaghan DA (2002) Measurement of resistant starch. *J AOAC Int*, 85(3): 665-675.
- McCracken KJ (1984) Effect of diet composition on digestive development of early-weaned pigs. *Proceedings of the Nutrition Society*, 43: 109A.
- McIntyre A, Gibson PR y Young GP (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 34(3): 386-391.
- Meance S, Achour L y Briend A (1999) Comparison of starch digestibility of a blended food prepared with and without extrusion cooking. *Eur J Clin Nutr*, 53(11): 844-848.
- Mentschel J, Leiser R, Mulling C, Pfarrer C y Claus R (2001) Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Arch Tierernahr*, 55(2): 85-102.
- Mentschel J y Claus R (2003) Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism*, 52(11): 1400-1405.
- Mevissen-Verhage EA, Marcelis JH, de Vos MN, Harmsen-van Amerongen WC y Verhoef J (1987) Bifidobacterium, Bacteroides, and Clostridium spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J Clin Microbiol*, 25(2): 285-289.

- Miles MJ, Morris VJ, Orford PD y Ring SG (1985) The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr Res*, 135: 271-281.
- Miller ER and Ullrey DE (1987) The pig as a model for human nutrition. *Ann Rev Nutr* 7: 361-382.
- Miller TL y Wolin MJ (1986) Methanogens in animal and human intestinal tracts. *Syst Appl Microbiol*, 7: 223-229.
- Mitamura R, Hara H y Aoyama Y (2004) Ingestion of raffinose promotes calcium absorption in the large intestine of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(2): 384-389.
- Mitsuoka T (1996) Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 5: 2-9.
- Moore WEC, Moore LVH, Cato EP, Wilkins TD y Kornegay ET (1987) Effect of high-fiber and high-oil diets on the faecal flora of swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1638-1644.
- Morales J, Perez JF, Baucells MD, Mourot J y Gasa J (2002a) Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn- and corn-sorghum-acorn based diets. *Liv Prod Sci*, 77: 195-205.
- Morales J, Perez JF, Martin-Orue SM, Fondevila M y Gasa J (2002b) Large bowel fermentation of maize or sorghum-acorn diets fed as a different source of carbohydrates to Landrace and Iberian pigs. *Br J Nutr*, 88(5): 489-498.
- Morand C, Levrat MA, Besson C, Demingue C y Remesy C (1994) Effect of a diet rich in resistant starch on hepatic lipid metabolism in the rat. *J Nutr Biochem*, 5: 138-144.
- Moritz JS, Cramer KR, Wilson KJ y Beyer RS (2003) Feed manufacture and feeding of rations with graded levels of added moisture formulated to different energy densities. *J Appl Poult Res*, 12: 371-381.

- Morrison WR (1993) Cereal starch granule development and composition. En: Seed Storage Compounds: Biosynthesis, Interactions and Manipulation. Eds: Shewry PR y Stobart K. Oxford Science Publications. Oxford. pp: 175-190.
- Mortensen FV, Nielsen H, Mulvaney MJ y Hesso I (1991) Short chain fatty acids dilate human colonic resistance arteries. *Gut*, 31:1391-1394.
- Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Labois CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ y Champ MM (2003) Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr*, 90(1): 75-85.
- Mosenthin R, Sauer WC, Henkel H, Ahrens F y Lange CFM (1992) Tracer studies of urea kinetics in growing pigs: II. The effect of starch infusion at the distal ileum on urea recycling and bacterial nitrogen excretion. *J Anim Sci*, 70: 3467-3472.
- Mourot J y Kouba M (1999) Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing Large White and Meishan pigs. *Reproduction, Nutrition, Development*, 39: 125-132.
- Muir JG, Yeow EG, Keogh J, Pizzey C, Bird AR, Sharpe K, O'Dea K y Macrae FA (2004) Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am J Clin Nutr*, 79(6): 1020-1028.
- Nagengast FM, Hectors MP, Buys WA y van Tongeren JH (1988) Inhibition of secondary bile acid formation in the large intestine by lactulose in healthy subjects of two different age groups. *Eur J Clin Invest*, 18(1): 56-61.
- National Research Council (NRC) (1998) Nutrient requirements of Swine. 10ª edición revisada ed. National Academy Press, Washington, D.C. (USA).
- Nestel P, Cehun M y Chronopoulos A (2004) Effects of long-term consumption and single meals of chickpeas on plasma glucose, insulin, and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr*, 79(3):390-395.
- Nishina PM y Freedland RA (1990) Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr*, 120(7): 668-673.

- Noakes M, Clifton PM, Nestel PJ, Le Leu R y McIntosh G (1996) Effect of high-amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr*, 64(6): 944-951.
- Noblet J, Seve B y Tran G (2004) Valoración energética y proteica de alimentos para porcino: propuestas francesas. XX Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Eds: Rebollar PG, de Blas C y Mateos GG. Fira de Barcelona, España. pp: 63-75.
- Nyman M, Asp NG, Cummings J y Wiggins H (1986) Fermentation of dietary fibre in the intestinal tract: comparison between man and rat. *Br J Nutr*, 55(3): 487-496.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Adachi T, Sakata T y Sakaguchi E (1995) Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J Nutr*, 125(9): 2417-2424.
- Olesen M, Rumessen JJ y Gudmand-Hoyer E (1994) Intestinal transport and fermentation of resistant starch evaluated by the hydrogen breath test. *Eur J Clin Nutr*, 48(10): 692-701.
- Omogbenigun FO, Nyachoti CM, Slominski BA (2004) Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. *J Anim Sci*, 82:1053-1061.
- Oostergetel GT y van Bruggen EFJ (1993) The crystalline domains in potato starch are arranged in a helical fashion. *Carbohydr Polym*, 21: 7-12.
- Owsley WF, Knabe DA y Tanksley TD Jr (1981) Effect of sorghum particle size on digestibility of nutrients at the terminal ileum and over the total digestive tract of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*, 52(3):557-466.
- Owsley WF, Orr DE Jr y Tribble LF (1986) Effects of age and diet on the development of the pancreas and the synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *J Anim Sci*, 63(2): 497-504.

- Pascual-Reas B (1997) A comparative study on the digestibility of cassava, maize, sorghum and barley in various segments of the digestive tract of growing pigs. *Livestock Research for Rural Development*, 9.
- Patridge GR (1993) In feed enzymes and antibodies. *Pig Veterinary Journal*, 31: 34-50.
- Pethick DW, Lindsay DB, Barker PJ y Northrop AJ (1981) Acetate supply and utilization by the tissues of sheep in vivo. *Br J Nutr*, 46(1): 97-110.
- Perez H y Oliva-Teles A (2001) Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205: 287-299.
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K y Menanteau J (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut*, 48(1): 53-61.
- Pettersson A y Lindberg JE (1997) Ileal and total tract digestibility in pigs of naked and hulled barley with different starch composition. *Animal Feed Science and Technology*, 66: 97-109.
- Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K y Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr*, 62(1): 121-130.
- Pitt P, de Bruijn KM, Beeching MF, Goldberg E y Blendis LM (1980) Studies on breath methane: the effect of ethnic origins and lactulose. *Gut*, 21(11): 951-954.
- Pluske JR, Pethick DW y Mullan BP (1998) Differential effects of feeding fermentable carbohydrate to growing pigs on performance, gut size and slaughter characteristics. *Animal Science*, 67: 147-156.
- Pluske JR, Siba PM, Pethick DW, Durmic Z, Mullan BP y Hampson DJ (1996) The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *Journal of Nutrition*, 126: 2920-2933.

- Pluske JR, Hampson DJ y Williams IH (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51: 333-371.
- Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I y Lee SC (1994) Determination of soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J AOAC Int*, 77(3):690-694.
- Raben A, Tagliabue A, Christensen NJ, Madsen J, Holst JJ y Astrup A (1994) Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response, and satiety. *Am J Clin Nutr*, 60(4):544-551.
- Rafter JJ, Eng VW, Furrer R, Medline A y Bruce WR (1986) Effects of calcium and pH on the mucosal damage produced by deoxycholic acid in the rat colon. *Gut*, 27(11): 1320-1329.
- Ramakrishna BS, Venkataraman S, Srinivasan P, Dash P, Young GP y Binder HJ (2000) Amylase-resistant starch plus oral rehydration solution for cholera. *N Engl J Med*, 342(5): 308-313.
- Ramakrishna BS, Roberts-Thomson IC, Pannall PR y Roediger WE (1991) Impaired sulphation of phenol by the colonic mucosa in quiescent and active ulcerative colitis. *Gut*, 32(1): 46-49.
- Reeves AR, D'Elia JN, Frias J y Salyers AA (1996) A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *J Bacteriol*, 178(3): 823-830.
- Reid CA y Hillman K (1999) The effects of retrogradation and amylose/amylopectin ratio of starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon. *Animal Science*, 68: 503-510.
- Reid CA, Hillman K, Henderson C y Glass H (1996) Fermentation of native and processed starches by the porcine caecal anaerobe *Clostridium butyricum* (NCIMB 7423). *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 191-198.

- Rerat A, Fiszlewicz M Giusi A y Vaugelade P (1987) Influence of meal frequency on postprandial variations in the production and absorption of volatile fatty acids in the digestive tract of conscious pigs. *J Anim Sci*, 64: 448-456.
- Ring SG, Gee JM, Whittam M, Orford P y Johnson IT (1988) Resistant starch: Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. *Food Chem*, 28: 97-109.
- Roberfroid M, Gibson GR y Delzenne N (1993) The Biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutrition Reviews*, 51: 137-146.
- Roby JF (1997) Polysaccharides I: Structure and Function. En: *Essentials of carbohydrate chemistry*. Ed: CR Cantor. Boston, USA. pp: 157-227.
- Roediger WE (1980) Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21(9):793-798.
- Roediger WE y Nance S (1986) Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br J Exp Pathol*, 67(6): 773-782.
- Rooney LW y Pflugfelder RL (1986) Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal of Animal Science*, 63: 1607-1623.
- Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K and Tasman-Jones C (1994) Comparison of the ileal and fecal digestibility of dietary amino acids in adult humans evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr* 71: 29-42.
- Royall D, Wolever TM, Jeejeebhoy KN (1990) Clinical significance of colonic fermentation. *Am J Gastroentero*, 85(10): 1307-1312.
- Sacquet E, Leprince C y Riottot M (1983) Effect of amylo maize starch on cholesterol and bile acid metabolisms in germfree (axenic) and conventional (holoxenic) rats. *Reprod Nutr Dev*, 23(4): 783-792.

- Sahyoun NR, Anderson AL, Kanaya AM, Koh-Banerjee P, Kritchevsky SB, de Rekeneire N, Tylavsky FA, Schwartz AV, Lee JS y Harris TB (2005) Dietary glycemic index and load, measures of glucose metabolism, and body fat distribution in older adults. *Am J Clin Nutr*, 82(3): 547-552.
- Sakamoto J, Nakaji S, Sugawara K, Iwane S y Munakata A (1996) Comparison of resistant starch with cellulose diet on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis in rats. *Gastroenterology*, 110(1): 116-20.
- Salyers AA y Leedle JAZ (1983) Carbohydrate metabolism in the human colon. En: *The Human Intestinal Flora in Health and Disease*. Ed: Hendges D. NY Academic Press, New York. pp: 129-146.
- Salyers AA (1995) Fermentation of polysaccharides by human colonic anaerobes. En: *Dietary Fibre: Mechanisms of Action in Human Physiology and Metabolism*. Eds: Cherbut C, Barry JL, Lairon D y Durand M. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 29-35.
- Sandstrom B, Andersson H, Kivisto B y Sandberg AS (1986) Apparent small intestinal absorption of nitrogen and minerals from soy and meat-protein-based diets. A study on human ileostomy subjects. *J Nutr*, 116(11): 2209-2218.
- Savage DC (1986) Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr*, 6: 155-178.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G y Kasper H (1992) Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 103(1): 51-56.
- Scheppach W, Fabian C, Sachs M y Kasper H (1988) The effect of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acid excretion in man. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 23: 755-759.
- Schweizer TF, Andersson H, Langkilde AM, Reimann S y Torsdottir I (1990) Nutrients excreted in ileostomy effluents after consumption of mixed diets with beans or potatoes. II. Starch, dietary fibre and sugars. *Eur J Clin Nutr*, 44(8):567-75.

- Sghir A, Chow JM y Mackie RI (1998) Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. *J Appl Microbiol*, 85(4): 769-777.
- Sharp R y Macfarlane GT (2000) Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates. *Appl Environ Microbiol*, 66(10): 4212-4221.
- Shillabeer G, Hornford J, Forden JM, Wong NC, Russell JC y Lau DC (1992) Fatty acid synthase and adipsin mRNA levels in obese and lean JCR:LA-cp rats: effect of diet. *J Lipid Res*, 33(1):31-39.
- Silvester KR, Englyst HN y Cummings JH (1995) Ileal recovery of starch from whole diets containing resistant starch measured in vitro and fermentation of ileal effluent. *Am J Clin Nutr*, 62(2): 403-411.
- Skrabanja V, Liljeberg Elmstahl HG, Kreft I y Bjorck IM (2001) Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, 49(1):490-496.
- Spencer H, Norris C, Derler J y Osis D (1991) Effect of oat bran muffins on calcium absorption and calcium, phosphorus, magnesium and zinc balance in men. *J Nutr*, 121(12): 1976-1983.
- Steinmetz KA y Potter JD (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, 2(5): 325-57.
- Svihus B, Klovstad KH, Perez V, Zimonja O, Sahlstrom S, Schuller RB, Jeksrud WK y Prestlokken E (2004) Physical and nutritional effects of pelleting of broiler chicken diets made from wheat ground to different coarsenesses by the use of roller mill and hammer mill. *Animal Feed Science and Technology*, 117: 281-293.
- Svihus B, Uhlen AK y Harstad OM (2005) Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 303-320.

- Snow P y O'Dea K (1981) Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in food. *Am J Clin Nutr*, 34(12):2721-3727.
- Stanogias G y Pearce GR (1985) The digestion of fibre by pigs. 2. Volatile fatty acid concentrations in large intestine digesta. *Br J Nutr*, 53(3): 531-536.
- Stephen AM, Haddad AC y Phillips SF (1983) Passage of carbohydrate into the colon. Direct measurement in humans. *Gastroenterology*, 85: 626-632.
- Sutton AL, Kephart KB, Verstegen MWA, Canh TT y Hobbs PJ (1999) Potential for reduction of odorous compounds in swine manure through diet modification. *J Anim Sci*, 77: 430-439.
- Szczodrak J y Pomeranz Y (1992) Starch-lipid interactions and formation of resistant starch in high-amylose barley. *Cereal Chem*, 69: 626-632.
- Tabeling R, Schwier S y Kamphues J (2003) Effects of different feeding and housing conditions on dry matter content and consistency of faeces in sows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 87(3-4): 116-121.
- Takase S, Goda T y Watanabe M (1994) Monostearoylglycerol-starch complex: its digestibility and effects on glycemic and lipogenic responses. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 40(1): 23-36.
- Tester RF, Karkalas J y Qi X (2004) Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60: 186-195.
- Tetens I, Livesey G y Eggum BO (1996) Effects of the type and level of dietary fibre supplements on nitrogen retention and excretion patterns. *Br J Nutr*, 75(3): 461-469.
- Thun MJ, Calle EE, Namboodiri MM, Flanders WD, Coates RJ, Byers T, Boffetta P, Garfinkel L y Heath CW Jr (1992) Risk factors for fatal colon cancer in a large prospective study. *J Natl Cancer Inst*, 84(19): 1491-1500.

- Topping DL y Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*, 81: 1031-1064.
- Topping DL, Mock S, Trimble RP, Storer GB y Ilman RJ (1988) Effects of varying the content and proportions of gum arabic and cellulose on caecal volatile fatty acid concentrations in the rat. *Nutr Res*, 8: 1013-1020.
- Topping DL, Ilman RJ, Clarke JM, Trimble RP, Jackson KA y Marsono Y (1993) Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs. *J Nutr* 123: 133-143.
- Topping DL, Fukushima M y Bird AR (2003) Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proc Nutr Soc*, 62(1):171-176.
- Topping DL, Gooden JM, Brown IL, Biebrick DA, McGrath L, Trimble RP, Choct M y Ilman RJ (1997) A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *Journal of Nutrition*, 127: 615-622.
- Tovar J, Bjorck IM y Asp NG (1990) Analytical and nutritional implications of limited enzymic availability of starch in cooked red kidney beans. *J Agric Food Chem*, 38: 488-493.
- Tovar J, Bjorck IM y Asp NG (1992) Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. *J Nutr*, 122(7): 1500-1507.
- Towle HC, Kaytor EN y Shih HM (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr*, 17:405-433.
- Truswell AS (1992) Glycaemic index of foods. *Eur J Clin Nutr* 46 (suppl 2): S91-S101.
- Tulung B, Remesy C y Demigne C (1987) Specific effect of guar gum or gum arabic on adaptation of cecal digestion to high fiber diets in the rat. *J Nutr*, 117(9): 1556-1561.

- Tybirk P (2004) El sistema danés de valoración de alimentos. XX Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Eds: Rebollar PG, de Blas C y Mateos GG. Fira de Barcelona, España. pp: 51-59.
- van der Meulen J, Bakker JGM, Smits B y de Visser H (1997a) Effect of source of starch on net portal flux of glucose, lactate, volatile fatty acids and amino acids in the pig. *Br J Nutr*, 78: 533-544.
- van der Meulen J, Bakker GCM, Bakker JGM, de Visser H, Jongbloed AW y Everts H (1997b) Effect of resistant starch on net portal-drained viscera flux of glucose, volatile fatty acids, urea, and ammonia in growing pigs. *J Anim Sci* 75: 2697-2704.
- van Dokkum W, Pikaar NA y Thissen JT (1983) Physiological effects of fibre-rich types of bread. 2. Dietary fibre from bread: digestibility by the intestinal microflora and water-holding capacity in the colon of human subjects. *Br J Nutr*, 50(1): 61-74.
- van Munster IP, Tangerman A y Nagengast FM (1994) Effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism, and mucosal proliferation. *Dig Dis Sci*, 39(4): 834-842.
- Varel VH, Robinson IM y Jung HJ (1987) Influence of dietary fiber on xylanolytic and cellulolytic bacteria of adult pigs. *Appl Environ Microbiol*, 53(1): 22-26.
- Vasanthan T y Bhatti RS (1996) Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular and high amylose barleys. *Cereal Chem*, 73: 199-207.
- Vernia P, Caprilli R, Latella G, Barbetti F, Magliocca FM y Cittadini M (1988) Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95(6): 1564-1568.
- Vervaeke IJ, Decuypere JA, Dierick NA y Henderickx HK (1979) Quantitative in vitro evaluation of the energy metabolism influenced by Virginiamycin and Spiramycin used as growth promoters in pig nutrition. *Journal of Animal Science*, 49: 846-856.

- Visek WJ, Clinton SK y Truex CR (1978) Nutrition and experimental carcinogenesis. *Cornell Vet*, 68(1): 3-39.
- Wang X, Brown IL, Evans AJ y Conway PL (1999) The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *J Appl Microbiol*, 87(5): 631-639.
- Weststrate JA y van Amelsvoort JM (1993) Effects of the amylose content of breakfast and lunch on postprandial variables in male volunteers. *Am J Clin Nutr*, 58(2): 180-186.
- Williamson G, Belshaw NJ, Self DJ, Noel TR Ring, SG, Cairns P, Morris VJ, Clark SA y Parker ML (1992) Hydrolysis of A- and B-type crystalline polymorphs of starch by α -amylase, β -amylase and glucoamylase-1. *Carbohydr Polym*, 18:179-187.
- Wiseman J, Pickard J y Zarkadas L (2001) Starch digestion in piglets. En: *The weane pig. Nutrition and management*, Eds: Varley MA and Wiseman J. CABI Publishing. Wallingford. pp: 65-80.
- Wong S y O'Dea K (1983) Importance of physical form rather than viscosity in determining the rate of starch hydrolysis in legumes. *Am J Clin Nutr*, 37(1): 66-70.
- Wurzburg OB (1986) Nutritional aspects and safety of modified food starches. *Nutr Rev*, 44(2):74-79.
- Yen JT, Nienaber JA, Hill DA y Pond WG (1991) Potential contribution of absorbed volatile fatty acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. *Journal of Animal Science*, 9: 2001-2012.
- Younes H, Levrat MA, Demigne C y Remesy C (1995a) Resistant starch is more effective than cholestyramine as a lipid-lowering agent in the rat. *Lipids*, 30(9): 847-853.
- Younes H, Garleb K, Behr S, Remesy C y Demigne C (1995b) Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. *J Nutr*, 125(4): 1010-1016.

- Younes H, Demigne C y Remesy C (1996) Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br J Nutr*, 75(2): 301-314.
- Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigne C, Rayssiguier Y y Remesy C (2001) Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr*, 86(4): 479-485.
- Young GP, McIntyre A, Albert V, Folino M, Muir JG y Gibson PR (1996) Wheat bran suppresses potato starch-potentiated colorectal tumorigenesis at the aberrant crypt stage in a rat model. *Gastroenterology*, 110(2): 508-514.
- Zhang W y Jackson DS (1992) Retrogradation behavior of wheat starch gels with differing molecular profiles. *J Food Sci*, 57: 1428-1432.
- Zhou XH, Kaplan ML y Zhou XH (1997) Soluble amylose cornstarch is more digestible than soluble amylopectin potato starch in rats. *Journal of Nutrition*, 127: 1349-1356.
- Zierler K (1999) Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol*, 276: E409-E426.
- Zobel HF (1988) Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Starke*, 40 : 1-7.