

**ESTUDIO COMPARADO DEL METABOLISMO DE
AMINOÁCIDOS Y DE LÍPIDOS EN EL CERDO IBÉRICO Y DE
UNA RAZA CONVENCIONAL:**

**Efectos sobre el crecimiento, el metabolismo muscular y la
calidad de sus productos**

Comparative study on amino acid and lipid metabolism on Iberian
and a conventional type pigs: effects on growth, muscle
metabolism and quality of its products

PATRICIA PALMA GRANADOS

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Estación Experimental
del Zaidín



Consejo Superior de
Investigaciones científicas

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Patricia Palma Granados
ISBN: 978-84-1306-509-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/62375>

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Economía y competitividad (Ref.: BES-2012-053078). El trabajo que se expone forma parte del proyecto: “Estudio comparado del metabolismo de aminoácidos y de lípidos del cerdo Ibérico y de una raza porcina magra: consecuencias sobre el crecimiento, la eficiencia de utilización de los nutrientes y la calidad de sus productos” (Ref. AGL2011-25360) financiado por el Ministerio de Economía y competitividad (MINECO)

La dirección de esta Memoria de Tesis Doctoral la han llevado a cabo las Dras. Rosa Nieto Liñán e Isabel Seiquer Gómez-Pavón, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Los resultados preliminares de los ensayos que recoge la presente Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

Palma-Granados P., Haro A., Nieto R., Lara L., Aguilera J. F., Seiquer I. 2015. Diferencias en el contenido muscular de hierro, cobre y cinc entre dos genotipos porcinos: Ibérico y Landrace x Large White. AIDA, Zaragoza. 19-20 Mayo. XVI Jornadas sobre Producción Animal 1, 320-322.

Palma-Granados P., Haro A., Seiquer I., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R. 2015. La deficiencia de lisina en la dieta promueve un aumento de grasa intramuscular en cerdos Ibéricos y de genotipo convencional. AIDA, Zaragoza. 19-20 Mayo. XVI Jornadas sobre Producción Animal 1, 323-325.

Palma-Granados P., Hidalgo-Checa N., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R. 2017. Efectos de la deficiencia en lisina sobre la composición corporal en cerdos Ibéricos y Landrace x Large White. AIDA, Zaragoza. 30-31 Mayo. XVII Jornadas sobre Producción Animal, 105-107.

Palma-Granados P., Lara L., Seiquer I., Aguilera J.F., Nieto R. 2017. Efecto del genotipo y de la deficiencia de lisina en la dieta sobre el perfil de aminoácidos del músculo y plasma en lechones. AIDA, Zaragoza. 30-31 Mayo. XVII Jornadas sobre Producción Animal, 288-290.

Palma-Granados P., Seiquer I., Nieto R. 2017. Actividad de enzimas lipogénicas en grasa dorsal y longissimus dorsi de lechones ibéricos y Landrace x Large White. AIDA, Zaragoza. 30-31 Mayo. XVII Jornadas sobre Producción Animal, 249-251.

Palma-Granados P., Hidalgo-Checa N., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R. 2016. Lysine deficiency and genotype affect amino acid composition of carcass protein of growing pigs. 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Krakov, Poland. 12-15 September. EAAA publication 137, 213-214.

Palma-Granados P., Haro A., Seiquer I., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R. 2016. Changes in muscle metabolism in Iberian and Landrace x Large-White pigs fed lysine deficient diets. 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Krakov, Poland. 12-15 September. EAAA publication 137, 153-154.

Palma-Granados P., Seiquer I., Nieto R. 2016. Dietary lysine deficiency affects lipogenic enzyme activity in muscle and backfat of Iberian and Landrace x Large White pigs. IX Internacional Symposium on Mediterranean pig, Portalegre, Portugal. 3-5 November. Book of abstracts 68.

Así mismo, forman parte de las siguientes publicaciones:

Palma-Granados P., Haro A., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R., Seiquer I. 2017. Differences on meat colour and composition between Landrace x Large White and Iberian pigs under identical nutritional and management conditions. Animal Production Science. IF: 1.371 (2016). Q: 1 (12/56) <https://doi.org/10.1071/AN16375>

Palma-Granados P., Haro A., Seiquer I., Lara L., Aguilera J. F., Nieto R. 2017. Similar effects of lysine deficiency in muscle biochemical characteristics of obese and lean piglets. Journal of Animal Science 95, 3025-3036. IF: 1,863 (2016). Q: 1 (8/58) Doi:10.2527/jas2017.13647.

*Palma-Granados P., Seiquer I., Benítez R., Óvilo C., Nieto R. Effects of lysine deficiency on carcass composition and activity and gene expression of lipogenic enzymes in muscles and backfat adipose tissue of fatty and lean piglets. *En preparación.**

Palma-Granados P., Lara L., Seiquer I. Aguilera J. F., Nieto R. Genotype and lysine deficiency affect amino acid composition of growing pigs. Animal (enviado)

“Siempre que enseñes, enseña a la vez a dudar de lo que enseñas”

Ortega y Gasset

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Figuras	3
Índice de Tablas.....	5
1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	7
2.- ANTECEDENTES	13
2.1 EL CERDO IBÉRICO	15
2.1.1 Origen, distribución geográfica y censo.....	15
2.1.2 Perfil metabólico del cerdo.....	24
2.2 METABOLISMO PROTEICO	31
2.2.1 Clasificación de aminoácidos	31
2.2.2 Renovación proteica y metabolismo de aminoácidos	32
2.2.3 Otras funciones de los aminoácidos	38
2.2.4 Necesidades en aminoácidos y proteína ideal.....	41
2.3 METABOLISMO LIPÍDICO.....	46
2.3.1 Biosíntesis	47
2.3.2 Lipólisis y β – oxidación.....	54
2.3.3 Grasa dorsal e intramuscular	55
2.4 EL TEJIDO MUSCULAR	62
2.4.1 Fibras musculares	62
2.4.2 Factores que afectan a las fibras musculares	65
2.4.3 El músculo y su relación con la calidad de la carne	68
3.- ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	75
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	77
3.1.1 Ensayo I	77
3.1.2 Ensayo II	83
3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	86
3.2.1 Determinación de la composición química de dietas y tejidos	86
3.2.2 Determinación de aminoácidos	87
3.2.3 Determinación de ácidos grasos	93
3.2.4 Determinación de Minerales	94
3.2.5 Medidas de color en el músculo. Coordenadas CIELAB (L^* , a^* y b^*)	96
3.2.6 Metabolitos y hormonas.....	97
3.2.7. Determinación de L-carnitina	98
3.2.8 Determinación de la actividad oxidativa en fibras musculares	100
3.2.9 Determinación de la actividad de enzimas lipogénicas	101
3.2.10 Cuantificación de la expresión génica.....	104

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
Artículo 1: Similar effects of lysine deficiency in muscle biochemical characteristics of obese and lean piglets	111
Artículo 2: Effects of lysine deficiency on carcass composition and activity and gene expression of lipogenic enzymes in muscles and backfat adipose tissue of fatty and lean piglets	137
Artículo 3: Differences on meat colour and composition between Landrace x Large White and Iberian pigs under identical nutritional and management conditions	161
Artículo 4: Genotype and lysine deficiency affect amino acid composition of growing pigs	189
5.- DISCUSIÓN GENERAL.....	211
1. Efecto de la deficiencia de lisina en la dieta sobre el metabolismo muscular y la composición corporal en cerdos Ibéricos y convencionales.....	213
2. Diferencias en la composición nutricional y características bioquímicas de músculos de cerdos Ibéricos y de una raza porcina convencional a distintos pesos de sacrificio, en idénticas condiciones nutricionales y de manejo	224
3. Influencia del genotipo en la composición en aminoácidos de las proteínas corporales y en la respuesta a la restricción de lisina en la dieta. Posibles consecuencias sobre el ajuste del perfil proteico ideal para el cerdo Ibérico en crecimiento	228
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	235
7.- SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	243
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	251

ÍNDICE DE FIGURAS

2.- ANTECEDENTES

Figura 2.1: Troncos porcinos primitivos.....	15
Figura 2.2: Clasificación de estirpes o variedades y líneas de Cerdo Ibérico.....	17
Figura 2.3: Censo de ganado porcino en la Unión Europea.....	18
Figura 2.4: Distribución geográfica de la población de cerdo Ibérico.....	19
Figura 2.5: Clasificación de los productos Ibéricos según su alimentación y pureza racial...	22
Figura 2.6: Censo de cerdos de la raza Ibérico criados según el RD 2014.....	23
Figura 2.7: Censo de productos certificados bajo el RD 4/ 2014.....	23
Figura 2.8: Comparación de la deposición proteica (g/día) y la ganancia de peso media (g/día) en diferentes etapas del cerdo Ibérico y el cerdo convencional.....	26
Figura 2.9: Composición química de la canal (g/kg) en cerdo Ibérico y cerdos convencionales en las etapas de 10-25 kg PV, 50-100 kg PV y 100-150 kg PV.....	27
Figura 2.10: Evolución comparativa de las concentraciones de proteína y grasa de la canal de cerdos Ibéricos y cerdos convencionales.....	28
Figura 2.11: Evolución de la retención proteica por MJ de ingesta energética en cerdos Ibéricos y convencionales en distintas etapas del ciclo productivo.....	28
Figura 2.12: Evolución de la eficiencia de utilización del alimento en cerdos Ibéricos y convencionales en distintas etapas del ciclo productivo.....	29
Figura 2.13: Movilización de aminoácidos libres.....	34
Figura 2.14: Degradación de los aminoácidos a uno de los siete intermediarios metabólicos comunes.....	37
Figura 2.15: Transporte de los ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria.....	40
Figura 2.16: Biosíntesis de ácidos grasos y principales enzimas implicadas.....	48
Figura 2.17: Vía de elongación y desaturación del ácido esteárico, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico.....	49
Figura 2.18: Formación de dobles enlaces por medio de enzimas desaturasas.....	50
Figura 2.19: La vía de β – Oxidación del acil-CoA graso.....	54
Figura 2.20: Organización general del músculo esquelético.....	63

3.- ASPECTOS METODOLÓGICOS

Figura 3.1: Comederos con las dietas deficientes y adecuadas en lisina.....	81
Figura 3.2: Animales durante el experimento.....	81
Figura 3.3: Diseño Experimental del Ensayo I.....	82
Figura 3.4: Resumen de los análisis realizados en las muestras del Ensayo I.....	82
Figura 3.5: Diseño Experimental del Ensayo II.....	85
Figura 3.6: Resumen de los análisis realizados en las muestras del Ensayo II.....	85
Figura 3.7: Reacción del fenilisotiocianato (PITC) con aminoácidos.....	88

Figura 3.8: Cromatograma de los aminoácidos procedentes de un hidrólizado de proteína.....	91
Figura 3.9: Cromatograma de los aminoácidos libres presentes en una muestra de plasma.....	92
Figura 3.10: Coordenadas CIELAB.....	96
Figura 3.11: Reacciones que intervienen en el proceso desde la acetilación de la L-carnitina hasta el consumo de NADH.....	99
Figura 3.12: Imágenes tomadas a microscopio (200 μm) de tejido con alta actividad NADPH-diaforasa (izquierda) y otra muestra con menor actividad (derecha).....	101

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 2:

Figure 1: Gene expression of lipogenic enzymes in backfat adipose tissue.....	150
Figure 2: Gene expression of lipogenic enzymes in <i>longissimus dorsi</i> muscle.....	151
Figure 3: Gene expression of lipogenic enzymes in <i>biceps femoris</i> muscle.....	152

Artículo 3:

Figure 1: Effect of genotype on FA indexes of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg and 115 kg of weight.....	174
Figure 2: Effect of genotype on FA ratios of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg and 115 kg of weight.....	175

ÍNDICE DE TABLAS

2.- ANTECEDENTES

Tabla 2.1: Fases de la producción de los cerdos Ibéricos	24
Tabla 2.2: Recomendaciones de proteína y lisina para la raza Ibérica comparadas con las recomendaciones para cerdo convencional	25
Tabla 2.3: Aminoácidos proteínogénicos esenciales y no esenciales para el cerdo	32
Tabla 2.4: Proteína ideal en ganado porcino	43
Tabla 2.5: Principales características de las distintas fibras musculares	64

3.- ASPECTOS METODOLÓGICOS

Tabla 3.1: Ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas. Ensayo I.....	78
Tabla 3.2: Ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales. Ensayo II .	84
Tabla 3.3: Gradiente utilizado en la determinación de aminoácidos hidrolizados.....	89
Tabla 3.4: Gradiente utilizado en la determinación de aminoácidos libres.....	90
Tabla 3.5: Valores certificados y determinados para los patrones externos (B.C.R.)	95
Tabla 3.6: Referencias de los kit comerciales de las hormonas analizadas y características de los ensayos	98
Tabla 3.7: Cebadores diseñados para la qPCR, detalles de los genes y las tasas de eficiencia de la PCR (eff, %) en los tejidos analizados.....	105

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 1:

Table 1: Ingredients and nutrient composition of experimental diets offered to Iberian and Landrace × Large White pigs.....	116
Table 2: Effects of genotype and dietary lysine content on performance of piglets growing from 10 to 25 kg BW	120
Table 3: Effects of genotype and dietary lysine content on muscle composition of piglets growing from 10 to 25 kg BW.....	122
Table 4: Effects of genotype and dietary lysine content on the FA composition of muscles of piglets growing from 10 to 25 kg BW	124
Table 5: Effects of genotype and dietary lysine content on plasma metabolite and hormone concentration of piglets growing from 10 to 25 kg BW	126

Artículo 2:

Table 1: Effect of genotype and dietary lysine content on body and carcass components of piglets growing from 10 to 25 kg BW.	145
Table 2: Effect of genotype and dietary lysine content on carcass chemical composition of piglets growing from 10 to 25 kg BW	146

Table 3: Effects of genotype and dietary lysine content on the FA composition of carcass of piglets growing from 10 to 25 kg BW	147
Table 4: Effect of genotype and dietary lysine content on lipogenic enzyme activities of backfat adipose tissue and muscles of piglets growing from 10 to 25 kg BW.....	148
Artículo 3:	
Table 1: Effects of genotype and dietary protein content on nutrient and mineral composition of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg weight.....	169
Table 2: Effects of genotype and dietary protein content on nutrient and mineral composition of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW	170
Table 3: Effects of genotype and dietary protein content on the fatty acid composition of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg BW	171
Table 4: Effects of genotype and dietary protein content on the fatty acid composition of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW	172
Table 5: Effects of genotype and dietary protein content on instrumental colour parameters of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg BW	176
Table 6 Effects of genotype and dietary protein content on instrumental colour parameters of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW	177
Table 7: Pearson's correlation coefficient (r) between instrumental colour parameters and mineral and fatty acid composition of <i>longissimus thoracis</i> (LT) and <i>biceps femoris</i> (BF) muscles.	182
Artículo 4:	
Table 1: Ingredients and nutrient composition of experimental diets offered to Iberian and Landrace × Large White pigs.....	194
Table 2: Effects of genotype and dietary lysine content on protein and amino acid concentration in the carcass of piglets growing from 10 to 25 kg BW	197
Table 3: Effects of genotype and dietary lysine content on protein and amino acid concentration in the longissimus dorsi muscle of piglets growing from 10 to 25 kg BW	199
Table 4: Effects of genotype and dietary lysine content on protein and amino acid concentration in the biceps femoris muscle of piglets growing from 10 to 25 kg BW ...	200
Table 5: Effects of genotype and dietary lysine content on amino acid concentration in the plasma of piglets growing from 10 to 25 kg BW	201

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La raza porcina Ibérica se caracteriza por una baja eficiencia productiva, crecimiento más lento, limitado desarrollo muscular y gran capacidad de acumulación de grasa corporal, en comparación con las razas porcinas modernas, seleccionadas para altas tasas de crecimiento y depósito de tejido magro. A estas características del porcino Ibérico, poco interesantes desde el punto de vista productivo, se unen otras como una mayor capacidad de adaptación al medio y rusticidad, y las apreciadas cualidades organolépticas de los productos que de él se obtienen, que confieren a esta raza un valor social, económico y medioambiental inestimable, además del propio valor intrínseco que supone la biodiversidad y riqueza genética que aporta. No en vano es considerada como un ejemplo de producción sostenible al que aspiran otras razas porcinas autóctonas europeas, que lamentablemente se encuentran en condiciones mucho más precarias y en algunos casos cercanas a la extinción.

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de esta raza singular. Hemos desarrollado un amplio programa de investigación con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre su nutrición y metabolismo. Por una parte, los trabajos realizados nos han permitido definir la relación proteína/energía óptima de la dieta para las distintas fases productivas, parámetro clave para establecer pautas y formular recomendaciones para la elaboración de piensos destinados a la alimentación de este genotipo porcino, adaptando la composición del alimento a las características fisiológicas del animal en cada etapa del crecimiento. Esta estrategia nos permite obtener un mejor aprovechamiento del alimento y reducir, con criterios biológicos, las pérdidas de nutrientes y su concentración en los efluentes al medio, ahorrando costes económicos y ambientales, siguiendo las tendencias actuales en producción porcina.

A la par que los trabajos mencionados, cuyos resultados tienen mayoritariamente un marcado carácter aplicado, hemos desarrollado estudios comparativos de carácter más básico en los que se aportan conocimientos que ayudan a explicar algunas de las peculiaridades metabólicas de esta raza autóctona. Entre ellos se encuentran los destinados a profundizar en el estudio del metabolismo proteico en distintos tejidos, el estudio de perfiles hormonales, la captación de nutrientes por los tejidos esplácnicos, o distintos aspectos del metabolismo lipídico. En alguno de estos estudios previos se observó una menor sensibilidad a un aporte deficiente de lisina en la dieta en cerdos de raza Ibérica comparados con cerdos Landrace -mantenidos ambos en idénticas condiciones experimentales- determinada en crecimiento, renovación de proteína total y de tejidos, y en las estimaciones de la retención de proteína corporal realizadas mediante balance de nitrógeno. Por otra parte, en cerdos de genotipo convencional se han descrito

modificaciones en distintos parámetros bioquímicos del músculo relacionadas con el aporte de aminoácidos esenciales en la dieta, entre ellos un incremento en la grasa intramuscular promovido por dietas deficientes en lisina. Más recientemente, otros investigadores han descrito que este efecto se limitaba a razas porcinas magras, pero no tenía lugar en razas grasas, similares a la Ibérica. Desde nuestra perspectiva, dada la importancia que en la economía de la producción porcina tiene el tejido muscular y la escasez de información respecto a cómo tienen lugar estos procesos, consideramos conveniente profundizar en este tipo de estudios comparados, utilizando una raza porcina convencional y la raza Ibérica como prototipo de raza porcina grasa. Este estudio se ha ampliado a la investigación de los posibles mecanismos implicados en el depósito de ácidos grasos en los tejidos, utilizando los mismos modelos, siempre en idénticas condiciones experimentales. Indudablemente, diferencias en este y otros procesos relacionados pueden tener consecuencias sobre las características nutricionales de la carne y la calidad de la misma, aspecto que también se aborda en parte de los trabajos llevados a cabo.

Por último, también se ha prestado atención a la composición aminoacídica de los músculos y la canal por sus posibles implicaciones en la definición de un perfil de aminoácidos en la dieta más ajustado a las características de esta raza grasa, buscando siempre aumentar la eficiencia del proceso de retención de proteína corporal, tan reducido en este genotipo en comparación con razas porcinas seleccionadas, y obtener información en estudios en los que se utilicen ambas razas simultáneamente, muy escasos en la bibliografía.

Con estos antecedentes, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio comparado de diversos aspectos del metabolismo de aminoácidos y lípidos en el cerdo Ibérico y en una raza porcina convencional, con especial énfasis en el tejido muscular y en el análisis de los posibles mecanismos implicados que puedan explicar las diferencias entre estos genotipos.

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

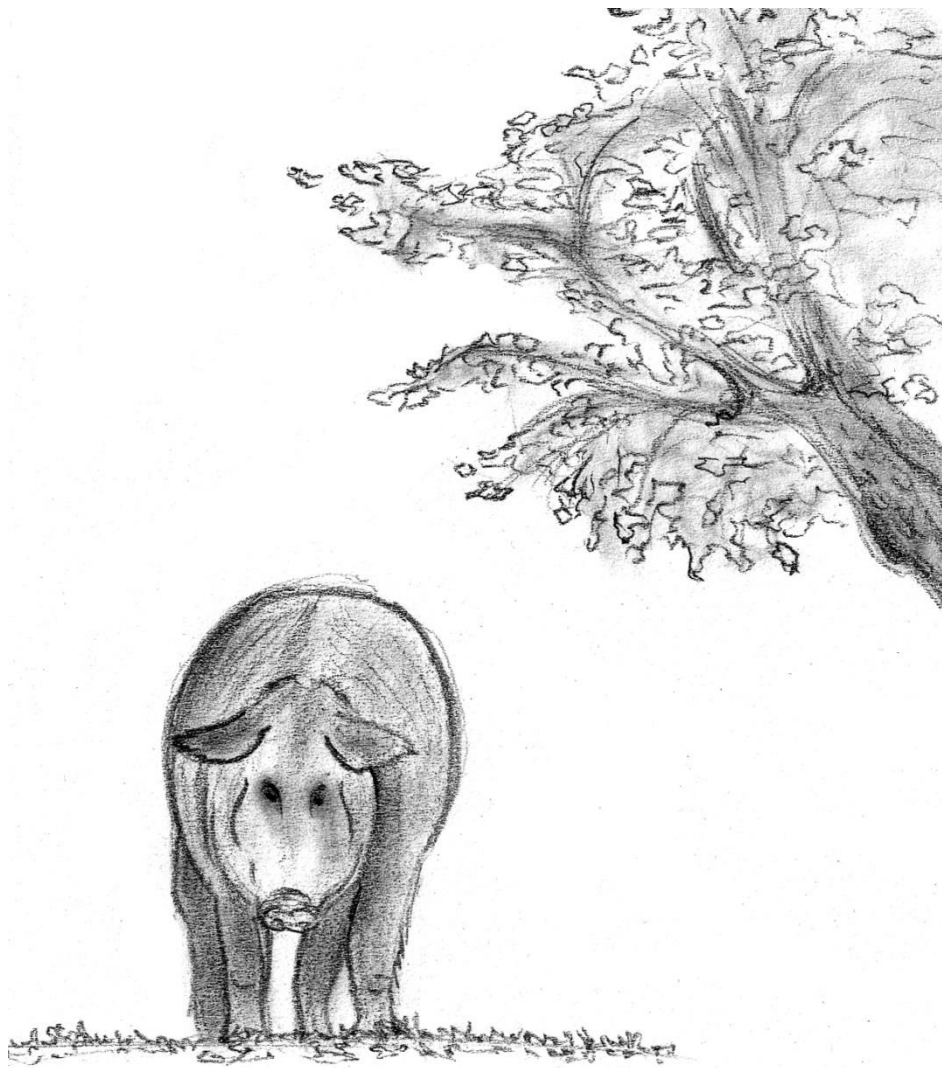
1. Determinar los efectos que la deficiencia en lisina de la dieta puede ejercer sobre el crecimiento, la composición corporal, las características bioquímicas del músculo y el perfil metabólico de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White en idénticas condiciones experimentales.

2. Analizar de forma comparada los principales mecanismos enzimáticos implicados en el depósito de grasa en el músculo y la canal.

3. Evaluar la composición nutricional y parámetros de calidad en músculos de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White en diferentes estadios de crecimiento, sometidos a idénticas condiciones nutricionales y de manejo.

4. Estudiar las diferencias en el perfil de aminoácidos de la proteína corporal de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White en condiciones de un aporte adecuado de aminoácidos o de deficiencia en lisina, y sus posibles consecuencias sobre la definición de un perfil proteico ideal para el cerdo Ibérico en crecimiento.

ANTECEDENTES



2.1 EL CERDO IBÉRICO

2.1.1 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CENSO

La Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico (AECERIBER) reconoce al cerdo Ibérico como una Agrupación Racial con gran diversidad interna, que junto al Cerdo Negro Mallorquín, constituyen el denominado Tronco Porcino Ibérico (Clemente y col., 2006).

Las razas porcinas actuales tienen su origen en el género *Sus*, que se divide en cuatro troncos porcinos: *Sus Eusus*, *Sus Striatosus*, *Sus Scrofa* y *Sus Mediterraneus* (AECERIBER, 2007). Según el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2017a) el tronco ibérico procedería del cruce de *Sus Scrofa* con *Sus Mediterraneus*, mientras que el tronco celta se originó a partir del apareamiento del *Sus Scrofa* con el subgénero *Striatosus* (Fig. 2.1).

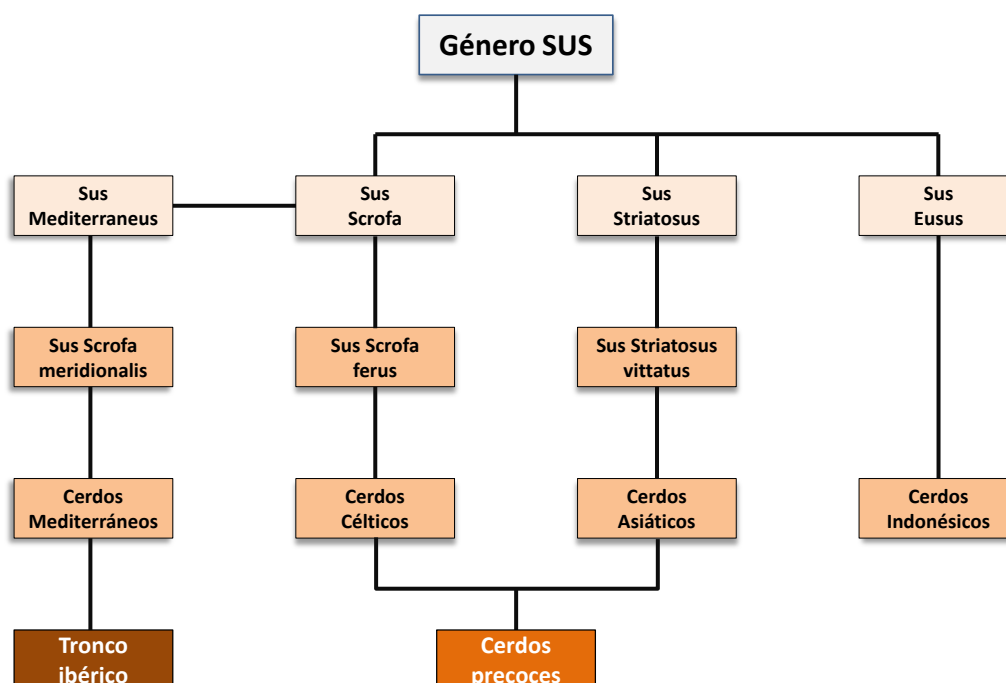


Figura 2.1 Troncos porcinos primitivos (Clemente y col., 2006).

El cerdo Ibérico tiene su origen en la interacción del cerdo de tipo mediterráneo con el ecosistema de bosque mediterráneo peninsular o dehesa. Estos bosques están caracterizados por albergar especies arbóreas del género *Quercus*, fundamentalmente encinas y alcornoques, surgiendo así el binomio Ibérico-bellota (Clemente y col., 2006). Esta especial simbiosis entre cerdo Ibérico y dehesa ha dotado a este animal de una elevada rusticidad que le ha permitido conseguir un óptimo aprovechamiento de los recursos naturales de la dehesa y soportar prolongados periodos de escasez de alimentos y condiciones climatológicas adversas. Su ancestral vinculación con la dehesa aún se mantiene en un porcentaje significativo de su censo, aunque en los últimos años la industria transformadora se surte mayoritariamente de cerdos ibéricos cruzados con la raza Duroc y cebados en sistemas intensivos (AECERIBER, 2011).

A pesar de su heterogeneidad, existen unas características morfológicas comunes entre las diferentes variedades del cerdo Ibérico, como son, su perfil fronto-nasal subcóncavo y frente proporcionada, órbitas oblicuas, con ojos grandes, vivos y de pupilas pigmentadas. Es un animal de tamaño medio, de proporciones medias o ligeramente alargadas, con la piel siempre pigmentada y las cerdas débiles y escasas. La coloración es variable, entre el negro intenso y el colorado (Boletín Oficial del Estado (BOE)-A-2016-3264). Basada en estas características fanerópticas, AECERIBER (Clemente y col., 2006) sugiere la clasificación de las variedades de Ibérico representada en la Figura 2.2.

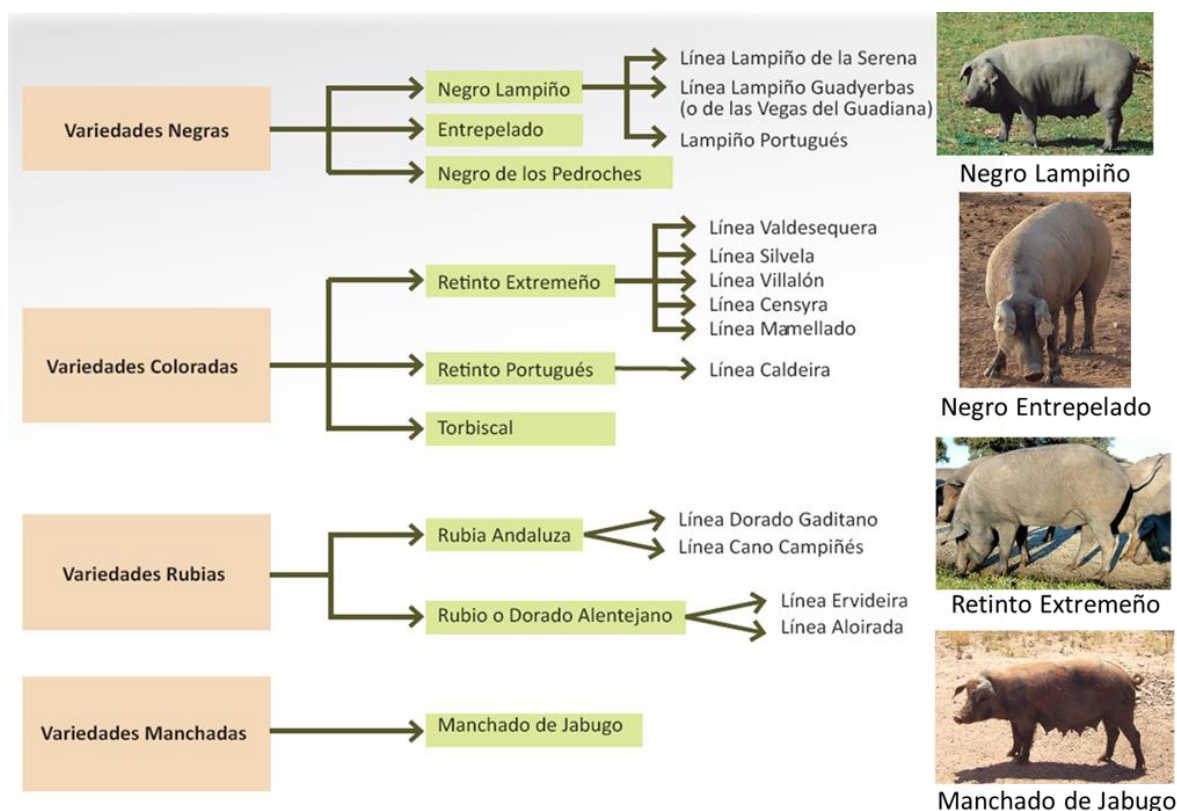


Figura 2.2 Clasificación de estirpes o variedades y líneas de cerdo Ibérico (elaborado a partir de Clemente y col 2006; Arrebola y Pelayo, 2016).

Actualmente, el MAPAMA reconoce solo cinco variedades de cerdo Ibérico: Retinto, Negro Lampiño, Negro entrepelado, Torbiscal y Manchado de Jabugo (BOE-A-2016-3264).

Actualmente, el sector porcino representa en España el 14% de la Producción Final Agraria. Dentro de las producciones ganaderas ocupa el primer lugar en cuanto a su importancia económica representando el 37% de la producción final ganadera. Es, por tanto, el sector más importante de nuestra ganadería y el que contribuye en mayor medida en la renta de nuestros ganaderos (datos 2015, MAPAMA 2017b). A nivel mundial la UE-28 es el segundo productor de carne de porcino, después de China. En este momento, España es la tercera potencia productora después de China y EEUU. Dentro del marco comunitario, España tenía en 2015 un censo de 28,3 millones de cerdos, cifra que ha experimentado un ligero aumento en 2016, llegando a alcanzar los 29,2 millones de ejemplares (MAPAMA 2017b), lo que sitúa a nuestro país

por primera vez como el país con mayor censo de la UE, por delante de Alemania (27,4 millones, Fig. 2.3).

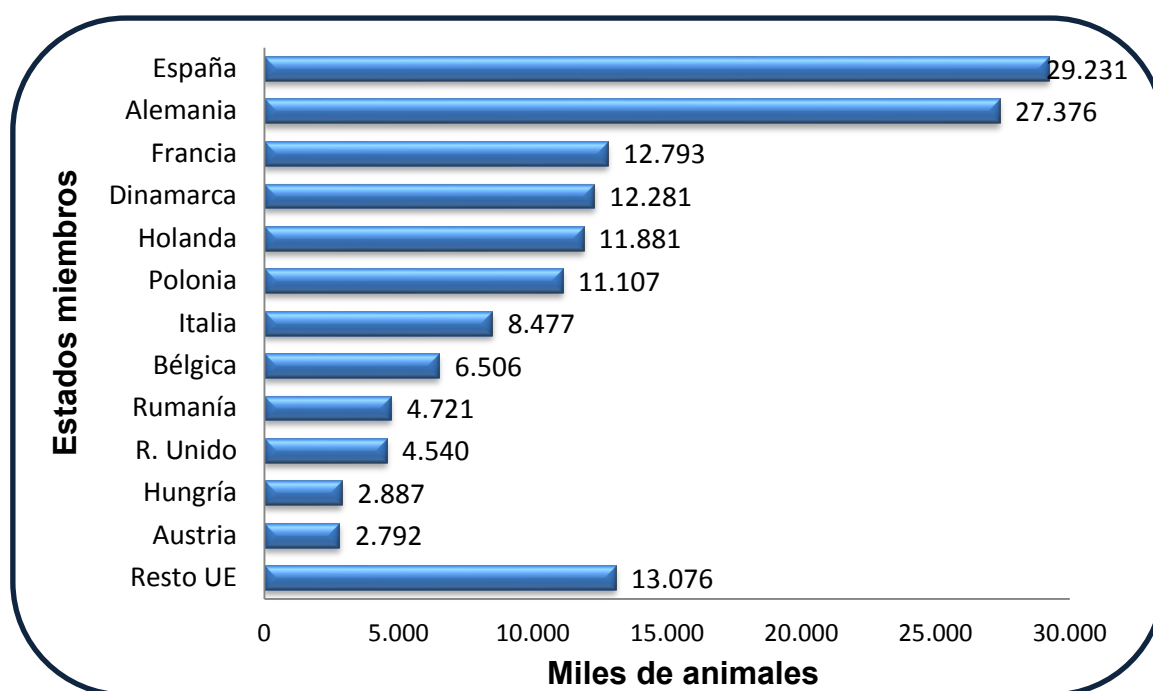


Figura 2.3 Censo de ganado porcino en la Unión Europea (datos 2016, MAPAMA, 2017b, Indicadores económicos).

Aunque la producción de Ibérico se considera en expansión, durante los años 60-80 sufrió una profunda crisis desencadenada por diversas causas (introducción de razas precoces como cerdos blancos o Duroc, cambios de hábitos alimenticios del consumidor, Peste Porcina Africana, deforestación de grandes áreas de dehesa, etc.), que supuso la extinción de algunas líneas puras de cerdo Ibérico. A partir de la década de los 90, gracias a la creciente preocupación por la recuperación del patrimonio genético y preservación del medio ambiente, al creciente interés por parte del consumidor en productos de calidad, junto a la creación de importantes asociaciones e instituciones orientadas a mejorar y salvaguardar a la raza Ibérica y sus productos (AECERIBER, ASICI, Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico, IBERAICE, las Denominaciones de Origen) se logró recuperar este tronco racial (AECERIBER, 2007), hasta alcanzar aproximadamente el 10% del censo porcino nacional (MAPAMA 2017b). A pesar de los desequilibrios de los últimos años (debidos principalmente a la crisis económica) que ocasionaron una caída de los precios en el mercado de cerdo

Ibérico, desde 2013 se ha experimentado una mejora en el sector con una tendencia al alza que ha hecho alcanzar los casi 3 millones de ejemplares en 2016. Esta tendencia también revela la mejora continua por parte de ganaderos y empresas del sector Ibérico en todo lo que refiere a la genética, control de la sanidad, instalaciones, nutrición, eficacia en la cubrición, manejo de partos, etc. (3tres3iberico, 2017).

Según el último censo del Registro General Informativo de Organismos Independientes de Control del Ibérico (RIBER), correspondiente a 2016, las comunidades autonómicas con mayor cantidad de ejemplares de cerdo Ibérico son Extremadura y Castilla y León, con el 36% y 31% de las cabezas censadas, respectivamente (1.111.571 y 950.376 ejemplares), seguida de Andalucía con 556.210 ejemplares (Fig. 2.4).

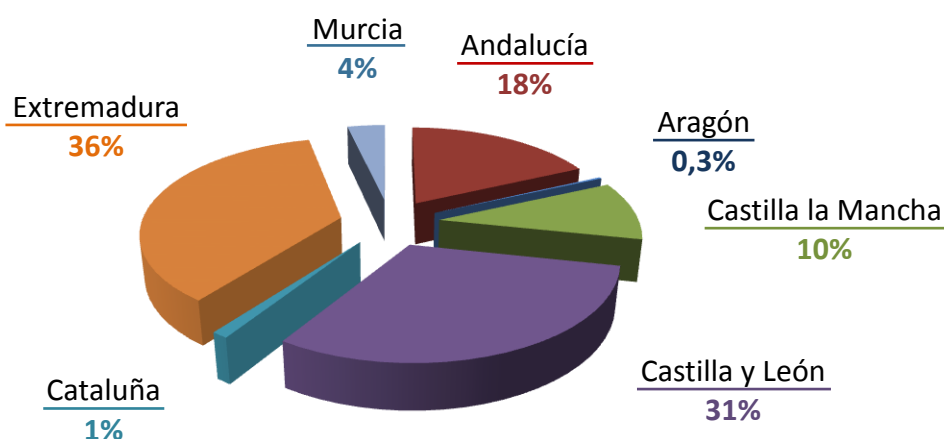


Figura 2.4 Distribución geográfica de la población de cerdo Ibérico (RIBER, 2016; MAPAMA 2017b).

El crecimiento del mercado de porcino Ibérico es un reflejo de la creciente demanda del consumidor de productos de calidad y precio intermedio entre las carnes procedentes de cerdo blanco y las de cerdos Ibéricos producidos en montanera. Para poder atender esta nueva demanda, el mercado ha ampliado la gama de calidades del genotipo Ibérico que han sido recogidas en diferentes normativas de calidad, la última en 2014 (Real Decreto 4/2014, del 10 de enero). Esta norma fue creada para definir las características de calidad y mercado de los productos Ibéricos presentes en el mercado, así como para concretar la tipología de

productos que pueden ser etiquetados como Ibéricos en función de factores ligados al sistema de alimentación de los animales y su pureza racial.

El Real Decreto 4/2014 (BOE-A-2014-318), por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta, la caña de lomo Ibérico y los productos frescos obtenidos del despiece de la canal, clasifica los animales según su alimentación y manejo, y designación racial. Se distinguen los siguientes tipos:

Designación por alimentación y manejo:

I. De bellota: Para productos procedentes de animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario. Las parcelas o recintos utilizados para este tipo de alimentación deberán estar identificados en el Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC). Los animales destinados a bellota deberán tener un peso de entre 92 -115 kg y una edad mínima de 12 meses, con una estancia en la dehesa de 60 días.

II. Para los productos procedentes de animales cuya alimentación y manejo, hasta alcanzar el peso de sacrificio, no estén entre los contemplados en el punto anterior se utilizarán las siguientes designaciones:

1. De cebo de campo: Animales, que aunque hayan podido aprovechar recursos de la dehesa o del campo, han sido alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, y cuyo manejo se realice en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre pudiendo tener parte de la superficie cubierta. La superficie mínima de suelo libre total por animal debe ser de 100m². Los animales destinados a este tipo de explotaciones deberán tener un peso medio de 105 kg y una edad mínima de 10 meses, con una estancia mínima en dichas explotaciones de 60 días.

2. De cebo: En caso de animales alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, cuyo manejo se realice en sistemas de explotación intensiva, con una superficie mínima de suelo libre total por animal de 2m². Los animales podrán ser sacrificados a los 150 kg y 10 meses de edad.

Designación por tipo racial:

I. 100% Ibérico: Cuando se trate de productos procedentes de animales con un 100% de pureza genética de la raza Ibérica, cuyos progenitores tengan así mismo un 100% de pureza racial Ibérica y estén inscritos en el correspondiente libro genealógico.

II. Ibérico: Cuando se trate de productos procedentes de animales con al menos el 50% de su porcentaje genético correspondiente a la raza porcina Ibérica, con progenitores de las siguientes características:

1. Ibérico al 75%: ejemplares procedentes de hembras de raza 100% Ibérica y machos Ibéricos al 50%, ambos inscritos en el libro genealógico de la raza.

2. Ibérico al 50%: ejemplares procedente de hembras de raza 100% Ibérica y machos de raza 100% Duroc, ambos inscritos en el libro genealógico de la raza.

Además, esta norma facilita al consumidor reconocer el producto de una forma más clara y precisa. En el etiquetado vendrá reflejada la descripción del producto seguida de la alimentación y el manejo del animal y su porcentaje racial. En el caso de jamones y paletas, llevarán un precinto de distinto color para cada denominación de venta (Fig. 2.5).

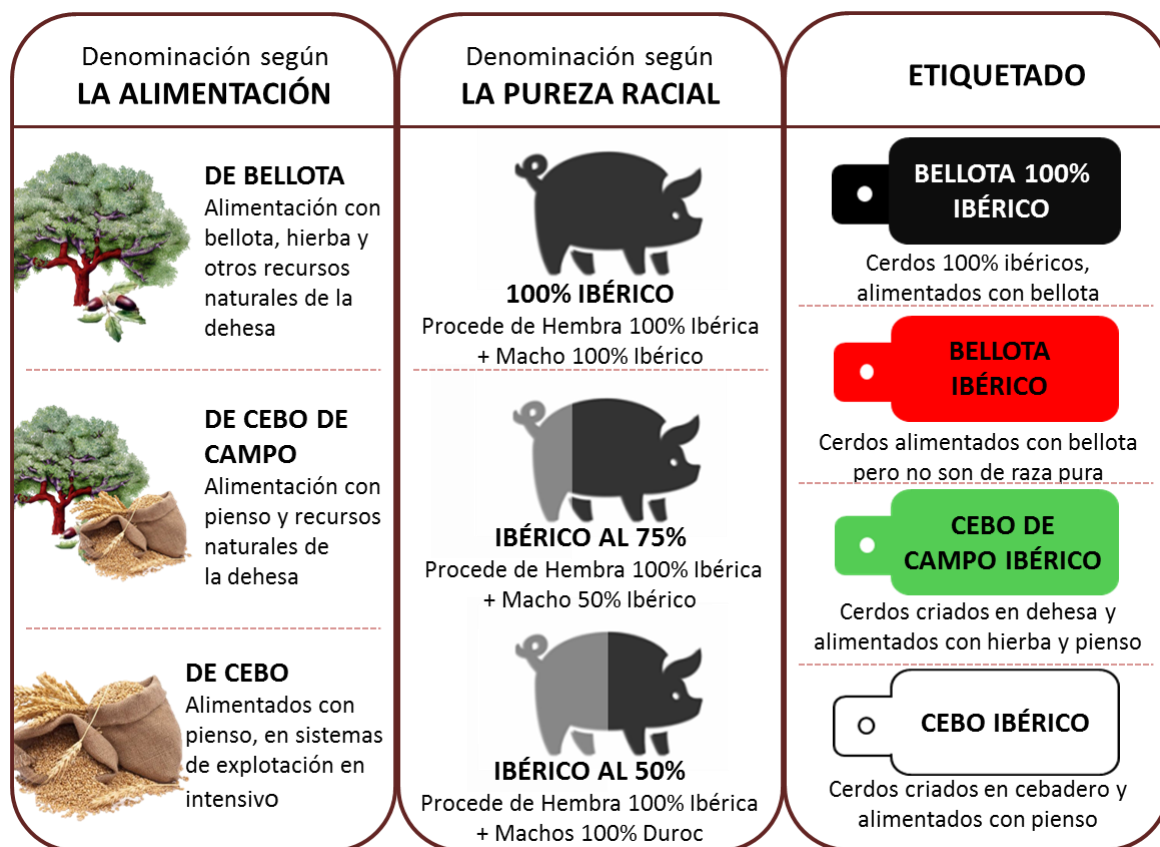


Figura 2.5 Clasificación de los productos Ibéricos según su alimentación y pureza racial. Elaboración propia a partir de la Norma de Calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos (BOE-A-2014-318).

Según esta nueva clasificación, en el último censo (RIBER 2016) los animales Ibéricos al 50% representaban el 85% del total de Ibéricos, mientras que los cerdos 100% Ibéricos alimentados con bellota representaron alrededor de un 7% del total (Fig. 2.6). De los 210.230 ejemplares 'Ibéricos 100%' destinados exclusivamente a bellota, el 62% se encuentran en Andalucía, donde destacan las provincias de Córdoba, Sevilla y Huelva.

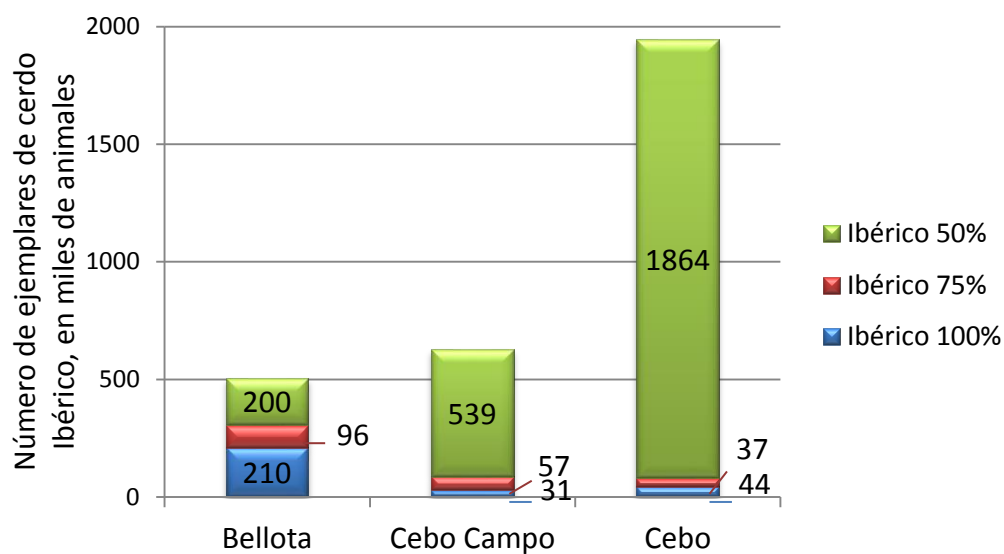


Figura 2.6 Censo de cerdos de raza Ibérica (100% y cruces) atendiendo a la clasificación del RD 4/2014 (RIBER 2016).

De acuerdo con RIBER (2016), la cantidad de productos certificados bajo la nueva norma de calidad se acercó a 13,5 millones de unidades (entre jamones, paletas y lomos) y unas 90 mil toneladas de carne fresca, mientras que el producto certificado bajo la normativa anterior fue de cerca de 2,4 millones de piezas (Fig. 2.7).

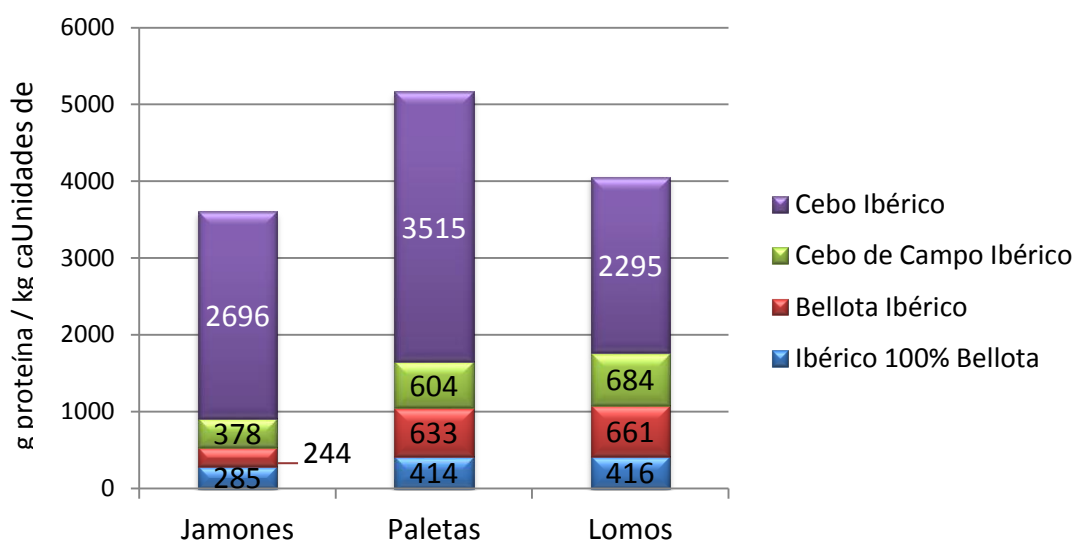


Figura 2.7 Censo de productos certificados bajo el RD 4/2014 (RIBER 2016).

Cabe destacar que cerca del 14% de jamones y el 19% de paletas ibéricas producidas (100% y cruces), pertenecen a animales criados exclusivamente en la dehesa, sin duda las piezas de mayor calidad y las más apreciadas por los consumidores.

2.1.2 PERFIL METABÓLICO DEL CERDO

A partir de los años 90, cuando la población de cerdo Ibérico se empezó a restaurar en nuestro país, las diferencias en cuanto a crecimiento, composición y calidad de los productos que presenta esta raza respecto a otras razas porcinas comerciales, condujo al planteamiento de actividades para conocer sus necesidades nutricionales específicas de cara a conseguir mejores rendimientos productivos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un amplio programa de investigación en el que se ha analizado, en distintas fases del ciclo productivo del cerdo Ibérico, la respuesta del animal, en términos de velocidad de crecimiento y de deposición proteica, a ingestas de proteína variables y a cambios en la ingesta energética. Esto nos ha permitido establecer recomendaciones de ingesta proteica y energética para los mismos.

El ciclo productivo del cerdo presenta varias fases (Tabla 2.1) con necesidades nutricionales y manejo variables. En la fase del lechón, por ejemplo, es en general cuando mayor síntesis proteica y crecimiento experimenta el animal, mientras que la fase de cebo es la más importante e influyente en cuanto a la composición y calidad de los productos.

Tabla 2.1

Fases de la producción de los cerdos Ibéricos

FASES	DENOMINACION	PESO APROXIMADO (kg)	EDAD APROXIMADA
Lactación	Lechón	1- 7	25-30 días
Cría		7 - 25	1 - 3 meses
Recría	Marrano	25 - 65	3 - 7 meses
	Primal	65 - 100	6 - 9 meses
Cebo	Gordo	>100	> 9 meses

Las recomendaciones de proteína bruta (de composición ideal) en la dieta sugeridas por nuestro grupo de investigación para la optimización en el rendimiento del cerdo Ibérico aparecen en la Tabla 2.2. También se muestran las recomendaciones para cerdo blanco elaboradas a partir de la información que proporciona la *British Society of Animal Science* (BSAS, 2003), el *National Research Council* (NRC, 2012) y la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA, 2013). Se debe tener en cuenta que dentro del cerdo blanco o convencional incluimos diferentes razas que han sido mejoradas con distintas finalidades (mayor contenido magro, mayor velocidad de crecimiento), de ahí que haya que considerar un rango entre las recomendaciones presentadas. Independientemente de las diferencias entre los diferentes genotipos de porcino convencional, se observa que estas razas poseen mayor potencial para depositar proteína corporal a lo largo de toda su vida productiva comparadas con los genotipos nativos como el Ibérico. Sus necesidades en cuanto a proteína son superiores, y como consecuencia, en la formulación de sus dietas se añaden cantidades de proteína bruta mayores que las que necesitan cerdos no mejorados

Tabla 2.2

Recomendaciones de proteína y lisina para la raza Ibérica comparadas con las recomendaciones oficiales del BSAS 2003, NRC 2012 y FEDNA 2013 para cerdo convencional, en diferentes etapas del ciclo productivo

	Proteína bruta / MS, g/kg	Proteína digestible aparente / EM, g/MJ ⁶	Lisina digestible aparente / EM, g/MJ ⁶
Ibérico			
10 - 25 kg ¹	201	11	0,7
25 - 50 kg ²	129	6,6 - 6,9	0,48 - 0,54
50 - 100 kg ³	95	5,2	0,36
100 - 150 kg ⁴	95	4,8	0,34
Convencional⁵			
10 - 25 kg	183 - 212	9,3 - 11	0,69 - 0,85
25 - 50 kg	152 - 186	8,4 - 9,9	0,65
50 - 100 kg	133 - 168	6,9 - 10	0,54 - 0,65
100 - 135 kg	116 - 156	5,3 - 10,5	0,41 - 0,69

¹Conde-Aguilera y col., 2011; Nieto y col., 2015a; ² Nieto y col., 2002; ³ Barea y col., 2007; ⁴ García-Valverde y col., 2008; ⁵ BSAS, 2003; NRC, 2012; FEDNA, 2013; ⁶ En caso del Ibérico la digestibilidad es fecal, y para el blanco es ileal.

Una fase importante para el animal es la fase inmediatamente posterior al destete, que está considerada una de las más eficientes en cuanto a la conversión de nutrientes en el tejido animal (Kendall y col., 2008). Por este motivo, se realizó un ensayo en lechones de entre 10 - 25 kg (Conde-Aguilera y col., 2011). Este estudio mostró que dietas con 201 g PB/kg MS, obtenían mejores parámetros productivos, con una ganancia de peso diaria de 416 g/d y una deposición de proteína corporal cercana a los 60 g/d (Tabla 2.2 y Fig. 2.8).

En cerdos en crecimiento, en el periodo comprendido entre 25 - 50 kg, los índices productivos más favorables se alcanzaron cuando los animales se alimentaron con dietas con un contenido proteico de 129 g proteína bruta por kilo de materia seca (g PB/kg MS) suministradas al 0,95 *ad libitum* (Nieto y col., 2002). En estas condiciones el animal alcanzó un crecimiento de 559 g /d con una retención máxima de proteína (Pmax.) de 74 g/d, frente a los 758-850 g/d y 122 g proteína/d, respectivamente, que se describen en la bibliografía para cerdos convencionales (NRC, 2012; Ruiz-Ascacibar y col., 2017; Fig. 2.8). Estas diferencias entre el cerdo Ibérico y los cerdos convencionales se mantienen en las siguientes fases de crecimiento.

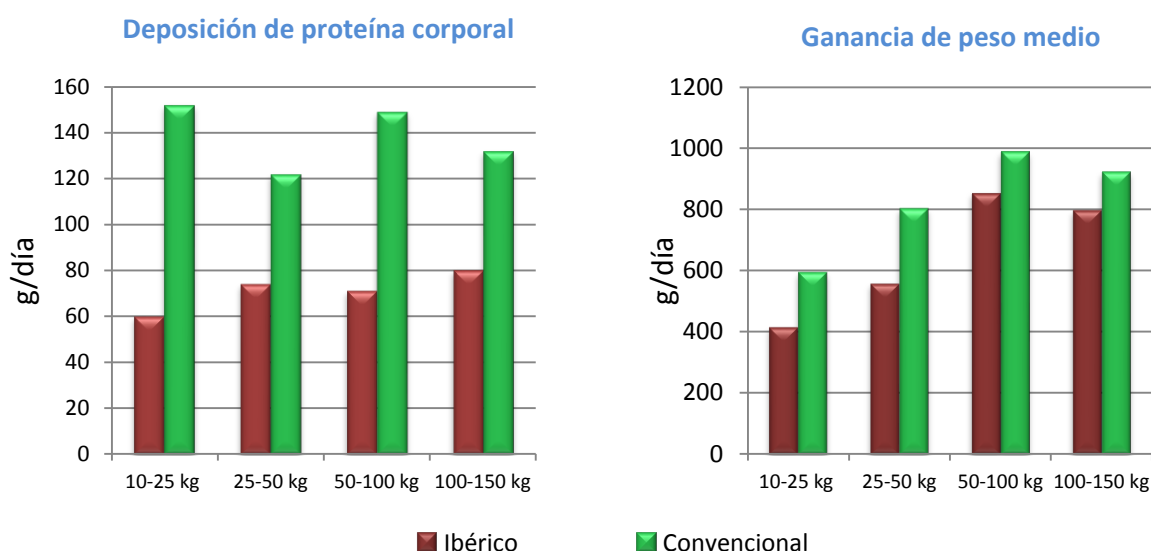


Figura 2.8 Comparación de la deposición proteica (g/día) y la ganancia de peso media (g/día) en diferentes etapas del cerdo Ibérico y el cerdo convencional.

Para cerdos en fase de crecimiento - cebo (50 - 100 kg PV) se reducen las recomendaciones de proteína bruta de la dieta comparadas con la fase anterior (Tabla 2.2). La mayor ganancia de peso diaria (854 g/d) y el valor máximo de proteína retenida (71 g/d) se alcanzaron con la dieta que proporcionaba 95 g PB/kg MS (Barea y col., 2007). En la fase de acabado, con animales de peso comprendido entre 100 y 150 kg (García-Valverde y col., 2008), se utilizó una dieta con una formulación similar a la anterior (95 g PB/kg MS), ya que conseguir dietas de menor concentración proteica con un balance óptimo de aminoácidos es casi imposible desde el punto de vista práctico. La retención de proteína observada fue aproximadamente 80 g/d (Tabla 2.2 y Fig. 2.8). Estos índices productivos nos confirman el reducido potencial de retención de proteína de la raza Ibérica en comparación con los registrados para genotipos convencionales (Friesen y col., 1995; NRC, 2012; Ruiz-Ascacibar y col., 2017).

Estas diferencias en ritmos de retención de proteína corporal y de crecimiento, se reflejan, como cabe esperar, en la composición química de la canal en las distintas fases estudiadas, con una menor concentración de proteína y mayor de grasa en el cerdo ibérico que en las razas mejoradas (Fig. 2.9 y 2.10).

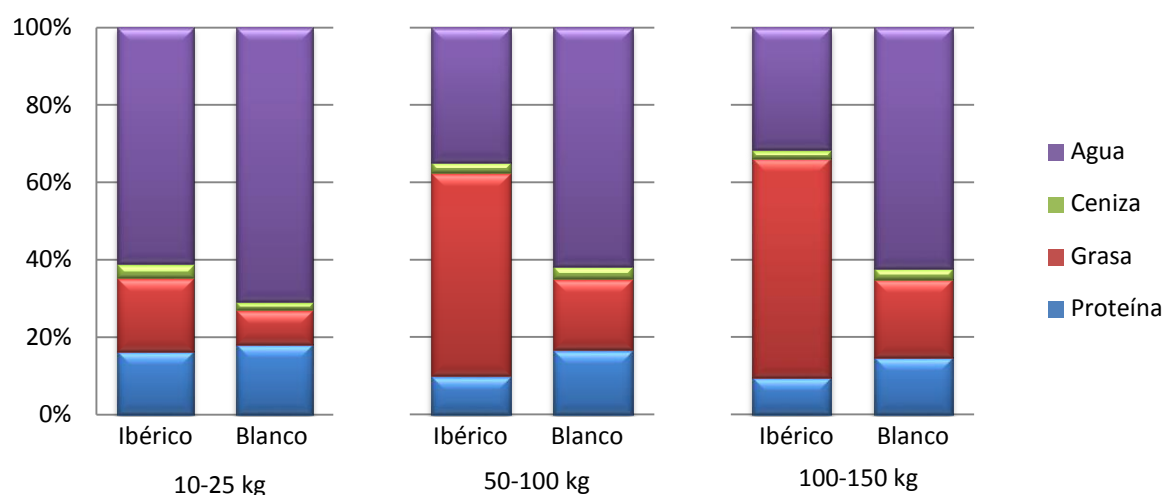


Figura 2.9 Composición química de la canal (g/kg) en cerdo Ibérico y cerdos convencionales en las etapas de 10-25 kg PV (Conde-Aguilera y col., 2011, Conde-Aguilera y col., 2010), 50-100 kg PV (Friesen y col., 1995, Barea y col., 2006) y 100-150 kg PV (Friesen y col., 1995, García-Valverde y col., 2008).

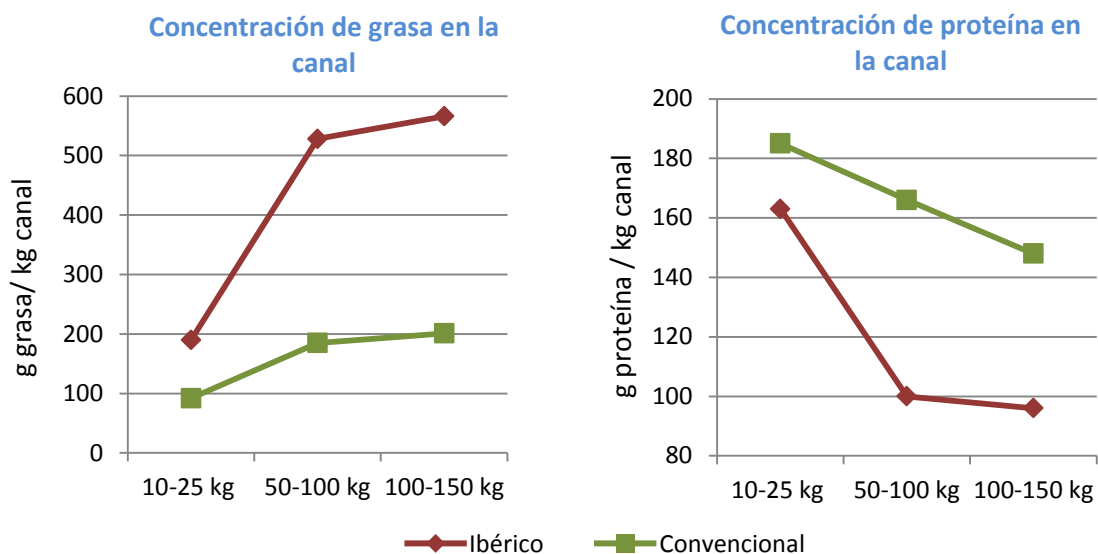


Figura 2.10 Evolución comparativa de las concentraciones de proteína y grasa de la canal de cerdos Ibéricos y cerdos convencionales.

Como observamos en los estudios anteriores, conforme el animal crece las necesidades cambian, en concordancia con sus cambios en composición corporal. Tanto en razas convencionales como no mejoradas, el potencial para la retención proteica disminuye conforme avanza el desarrollo del animal (van Lunen y Cole, 1996; Fig. 2.11).

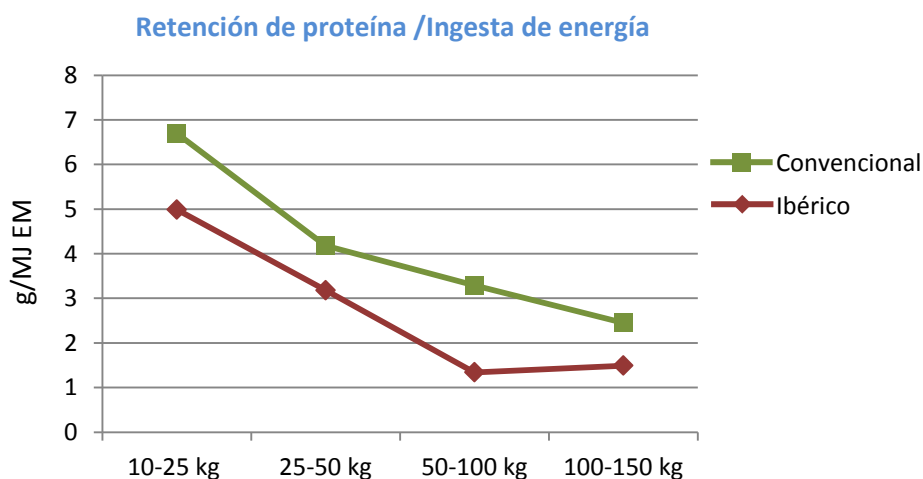


Figura 2.11 Evolución de la retención proteica en función de la ingesta energética (g/MJ EM) en cerdos Ibéricos y convencionales en distintas etapas del ciclo productivo

En conjunto, estos trabajos ponen de manifiesto las diferencias entre las necesidades de proteína entre razas mejoradas y razas nativas de tipo graso, como la Ibérica. También se han dedicado esfuerzos a comprender las razones biológicas responsables de estas diferencias metabólicas. En un estudio comparado con cerdas de raza Ibérica y Landrace de 25 kg aproximadamente (Rivera-Ferre y col., 2005), se estudiaron los procesos de síntesis y degradación proteica mediante técnicas isotópicas. Se analizó la tasa fraccional de síntesis proteica (porcentaje de la masa proteica total sintetizada a diario) en los músculos *Longissimus dorsi*, *Biceps femoris*, y *Semimembranosus*. Curiosamente, los tres músculos estudiados tuvieron tasas fraccionales de síntesis proteica superiores en las cerdas Ibéricas. Sin embargo, el tamaño de todos los músculos era menor que en las cerdas Landrace. Estos resultados sugieren que en los músculos de cerdo Ibérico, las altas tasas de síntesis y necesariamente, de degradación proteica, dan como resultado una menor retención de proteína y menor masa muscular. Como consecuencia, el coste energético de la retención de proteína en el organismo sería mayor en la raza Ibérica, lo que permite explicar, al menos en parte, la menor eficiencia de retención proteica corporal (Fig. 2.11) y de utilización del alimento en la raza Ibérica (Fig. 2.12).

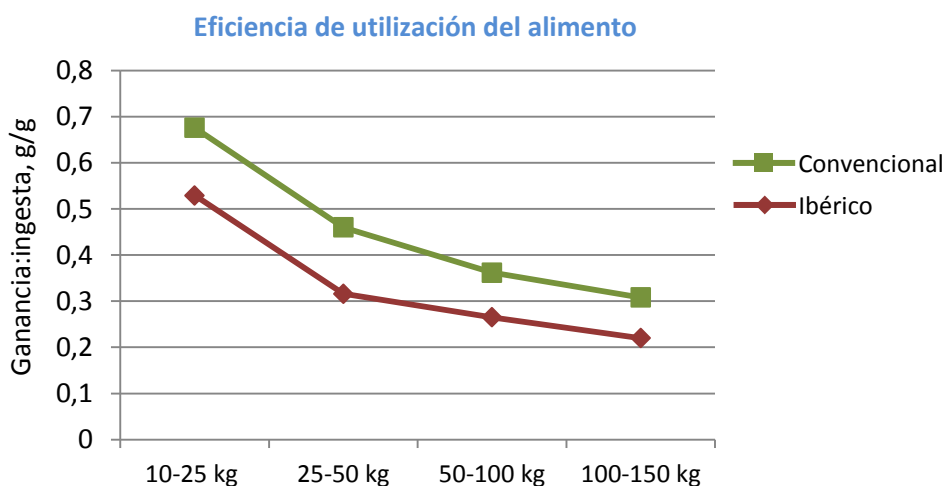


Figura 2.12 Evolución de la eficiencia de utilización del alimento (ganancia peso:ingesta de alimento) en cerdos Ibéricos y convencionales en distintas etapas del ciclo productivo.

De manera generalizada, la composición en aminoácidos de la proteína en las dietas para cerdos, independientemente de sus características metabólicas, se hace siguiendo el concepto de “proteína ideal” (desarrollado para cerdos convencionales,

debido principalmente a la falta de datos para otras razas de crecimiento lento. Sin embargo, es cuestionable el uso de este perfil como el más adecuado para el cerdo Ibérico. La lisina es el primer aminoácido limitante en las dietas de porcino. En recientes trabajos de Nieto y col. (2015a), se determinó una cantidad óptima de lisina de 63,7 g/kg proteína en la dieta para la raza Ibérica para alcanzar el máximo crecimiento magro en cerdos de 10 a 25 kg, cantidad inferior en un 13%, aproximadamente, a la recomendada para el cerdo blanco (NRC, 2012. Tabla 2.2).

La mejora genética a la que el cerdo blanco ha sido sometido durante décadas, ha dado lugar a animales con mejores tasas de eficiencia en el uso del alimento, mayor crecimiento, alta deposición de proteína y menor ingesta voluntaria (van Lunen y Cole, 1996). En un estudio comparado realizado con cerdos de raza Ibérica y Landrace de entre 87 - 108 kg, se observó que los cerdos de genotipo Ibérico tuvieron una ingesta voluntaria de alimento media de 3,5 kg/d frente a los 2,7 kg de los cerdos Landrace (Morales y col., 2002). En la línea de estos resultados se encuentran los obtenidos por Nieto y col. (2001) en un estudio en el que se determinó la ingesta voluntaria de cerdos Ibéricos en los periodos de crecimiento comprendidos entre 15 - 50 kg y 50 - 100 kg de peso vivo, respectivamente. La mayor capacidad de ingesta voluntaria de alimento por parte del genotipo Ibérico podría estar relacionada con una menor digestibilidad de nutrientes (Barea y col., 2011) que resulta en una mayor ingestión, o con los niveles de la hormona leptina. Esta hormona se produce en los adipocitos y se encarga de regular el apetito. Sin embargo, en cerdas Ibéricas y Landrace de aproximadamente 25 kg de peso, en idénticas condiciones experimentales, la concentración de leptina plasmática fue muy superior en las cerdas Ibéricas, lo que sugiere resistencia a la acción de la leptina circulante (Fernández-Figares y col., 2007), probablemente relacionada con la mutación encontrada en la raza Ibérica del gen del receptor de la leptina (*LEPR*), asociada a una menor expresión a nivel del hipotálamo (Óvilo y col., 2010). Otra hormona relacionada con la ingesta y el crecimiento es la grelina. La grelina puede presentarse de dos formas diferentes, acilada o desacilada, la primera está asociada al aumento de ingesta de alimento y a la ganancia de peso, mientras que la forma desacilada tiene efectos opuestos (Soares y Leite-Moreira, 2008). Existen diferencias en la concentración de estas hormonas respecto al sexo, con mayor cantidad de grelina acilada en hembras que en machos castrados de la raza Ibérica (Orengo y col., 2014), mientras que en cerdos del genotipo Landrace se han determinado mayores niveles que en cerdos Duroc y Yorkshire,

ligeramente más grasos que los anteriores (Lents y col., 2016). Estas observaciones coinciden con resultados obtenidos en humanos, donde individuos obesos presentaban niveles de grelina inferiores a aquellos más magros (Yang y col., 2009).

Se han estudiado otras hormonas por el papel que desempeñan en la regulación de la retención de proteína corporal y el crecimiento, y su posible contribución a la desigual acreción de proteína y tasa de crecimiento entre distintos genotipos. La insulina, la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), participan en la regulación del metabolismo proteico y energético del cuerpo, incluyendo la renovación de proteína en el músculo (Breier, 1999; Liu y col., 2006). Estas hormonas, GH e IGF-1, sus proteínas de unión asociadas y sus receptores trabajan juntos como un sistema multi-nivel hormonal denominado eje somatotrópico (Tomas y col., 1992; Breier, 1999), que ha sido considerado como una ruta clave en la regulación del crecimiento muscular. No se encontraron diferencias en las concentraciones de GH ni en metabolitos como el colesterol y los triglicéridos entre el genotipo Ibérico y Landrace (Fernández-Figares y col., 2007). Mientras que la concentración tanto de IGF-1 como de insulina fueron mayores en cerdos Ibéricos que en los de tipo convencional, lo que sorprende, dado el menor potencial de crecimiento de estos. Por otro lado, los niveles de creatina son menores en la raza Ibérica, de acuerdo al menor tamaño de sus músculos, ya que la creatina es usada como fuente de energía en el músculo y está relacionada con la masa muscular.

2.2 METABOLISMO PROTEICO

2.2.1 CLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son moléculas orgánicas formadas por un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo ($-COOH$) y una cadena lateral carbonada específica para cada aminoácido. Las proteínas son polímeros de aminoácidos donde el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro. Debido a las variaciones en su cadena, los aminoácidos tendrán propiedades bioquímicas y funcionales diferentes (Brosnan, 2001; Wu y col., 2007; Suenaga y col., 2008). Se conocen alrededor de 300

aminoácidos en la naturaleza, de los cuales sólo 20 pueden ser utilizados para la formación de proteína (proteínogénicos). El resto de aminoácidos están implicados en el metabolismo o son derivados postranscripcionales.

Tradicionalmente los aminoácidos son clasificados como esenciales (indispensables) o no esenciales (dispensables; Fig. 2.13). Los aminoácidos esenciales son aquellos cuya cadena carbonada no puede ser sintetizada *de novo*, o lo es de manera insuficiente, por parte del animal para cubrir sus necesidades, y por tanto, deben ser proporcionadas por la dieta. Los aminoácidos no esenciales, por el contrario, son aquellos que pueden ser sintetizados por el animal en las cantidades necesarias para cubrir sus necesidades. En determinadas fases del desarrollo ciertos aminoácidos dispensables pueden no serlo, como es el caso de la arginina en cerdos neonatos (Wu, 2009).

Tabla 2.3

Aminoácidos proteínogénicos esenciales y no esenciales para el cerdo

ESENCIALES		NO-ESENCIALES	
Arginina	Lisina	Alanina	Glicina
Histidina	Treonina	Aspartato	Prolina
Isoleucina	Valina	Cisteína	Serina
Fenilalanina	Metionina	Glutamato	Tirosina
Leucina	Triptófano	Glutamina	Asparagina

Algunos de estos aminoácidos actúan, además, como reguladores clave en rutas metabólicas implicadas en el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad. Asimismo, maximizan la eficiencia de utilización del alimento, mejoran la retención de proteína, reducen la adiposidad y mejoran la salud.

2.2.2 RENOVACIÓN PROTEICA Y METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Las proteínas corporales están sometidas a una continua renovación, mediante la síntesis y la degradación de las mismas. Este proceso es conocido como renovación o *turnover* proteico. El balance neto de este proceso será lo que determine la

deposición de proteína en los tejidos. La síntesis y la degradación proteicas son procesos con un alto coste energético; sobre todo la síntesis, dado el gasto que supone la formación de las cadenas peptídicas, del 23 al 33% del consumo total de oxígeno del organismo (Lobley, 1994). En conjunto, ambos procesos pueden suponer hasta un 40% del calor producido (Lobley, 1988). La regulación de la renovación proteica corporal total está determinada tanto por factores hormonales, como no hormonales, como la nutrición y el ejercicio (Breier, 1999). Para Waterlow (1999) los factores más importantes son los niveles de insulina y el aporte de aminoácidos procedentes la dieta.

La utilización productiva de la proteína dietética es el resultado de su digestión y absorción, el catabolismo de los aminoácidos, su utilización para la producción de energía y síntesis de otros compuestos y, finalmente, del balance entre los procesos de síntesis y degradación proteica en las células del organismo. Las proteínas procedentes de la dieta son digeridas en el intestino delgado, donde se liberan aminoácidos libres y oligopéptidos que son absorbidos por los enterocitos. Una vez absorbidos, los aminoácidos pasan a la sangre y al sistema linfático, y desde la vena portal al hígado (Jobgen y col., 2006; Davila y col., 2013). En general, la absorción de aminoácidos libres en el intestino delgado es más rápida que la absorción de aminoácidos unidos a proteína, y las tasas de absorción de aminoácidos ligados a proteínas varían y pueden ser afectados por la fuente de proteína, su grado de procesamiento y la energía de la dieta (Leibholz y col., 1986). En cerdos, la absorción de lisina libre es completa al final del íleon, y la concentración en la lisina plasmática alcanza su máximo de 1 a 2 horas después de su ingesta (Leibholz y col., 1986).

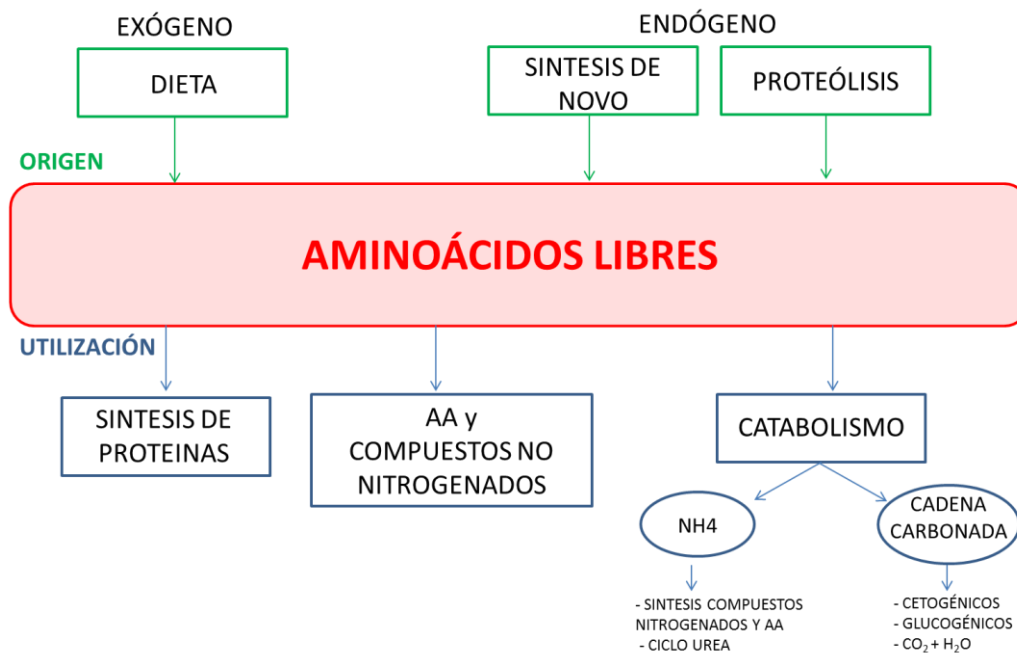


Figura 2.13 Movilización de aminoácidos libres. Elaboración propia a partir de Cynober, 2002.

Existe un compartimento o *pool* de aminoácidos libres disponibles en los diferentes fluidos corporales como el intersticial, el intracelular, el plasma y la linfa, entre otros. Los diferentes compartimentos de aminoácidos libres se encuentran en un equilibrio dinámico que refleja los movimientos de entrada y salida al *pool* (Fig. 2.13). Cuando deseamos interpretar los datos de las concentraciones de aminoácidos en plasma (el resto de *pools* de aminoácidos libres serán reflejo de este) debemos diferenciar la fase de alimentación en la que se encuentra el animal. La fase postprandial nos proporciona información sobre la absorción de los diferentes aminoácidos procedentes de la dieta; mientras que la fase postabsortiva (ayuno) refleja la suma total del flujo metabólico de todos los órganos y tejidos (movimiento de los aminoácidos de las células para la formación de proteína, degradación proteica, o desaminación de los aminoácidos en exceso o interacción entre ellos; Yen y col., 2004; Shikata y col., 2007; Bröer, 2008). Las concentraciones de aminoácidos en plasma son mantenidas relativamente constantes en la fase postabsortiva de los animales sanos, pero los niveles circulantes de la mayoría de los aminoácidos bajan en condiciones catabólicas y cuando éstos se encuentran enfermos (Wu, 2009).

Las interacciones entre aminoácidos en el organismo del animal alteran la liberación esperada de aminoácidos en la sangre procedente de la dieta. La concentración en exceso o deficiente de algunos aminoácidos en la dieta puede afectar al perfil plasmático de otros aminoácidos; por ejemplo, la lisina afecta al metabolismo de casi todos los aminoácidos, aunque no es influenciado por otros (Shikata y col., 2007). A pesar de que Braude y col. (1974) observaron que un aumento gradual de lisina en la dieta no afectaba a las concentraciones plasmáticas de otros aminoácidos, en otro estudio similar (Roy y col., 2000) con cerdos en crecimiento alimentados con dietas deficientes, adecuadas o excesivas en lisina, se comprobó que la concentración plasmática de lisina aumentó mientras que las concentraciones de isoleucina, taurina, treonina y valina disminuyeron a medida que aumentaba la concentración de lisina en la dieta. Otro ejemplo de interacciones entre aminoácidos es la interacción entre los tres aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina (BCAA). García-Villalobos y col. (2012) trataron de explicar la complejidad de los procesos de absorción y su concentración en plasma. Según estos autores, las típicas dietas formuladas para cumplir con las necesidades en lisina contienen un exceso de leucina, que puede deprimir la absorción de la lisina causando, a su vez, una reducción del crecimiento en el animal. Esta alteración en la absorción de lisina puede ser debido a que la disponibilidad de este aminoácido para la síntesis de proteínas musculares depende de la abundancia y actividad de sus transportadores. La lisina es transportada principalmente a través de la membrana celular por los sistemas b⁰ + AT y CAT-1 (Majumder y col., 2009). El sistema b⁰ + AT intercambia leucina por lisina (Torras-Llort y col., 2001). Los resultados de este estudio indicaron que la relación entre leucina y lisina en la dieta afecta a la expresión de los transportadores catiónicos de aminoácidos en el yeyuno y en el músculo, y por lo tanto, afecta al perfil de aminoácidos absorbidos y presentes en el plasma.

Los carbohidratos y los lípidos son las principales fuentes energéticas para los animales, siendo la oxidación de aminoácidos para la producción de ATP un proceso altamente ineficiente (Wu, 2009). Aun así, existen algunas circunstancias metabólicas por las que se puede someter a los aminoácidos a su completa oxidación, hasta amonio y CO₂ a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs), para proporcionar energía al animal (Liao y col., 2015). Por ejemplo, en situaciones donde existe un excedente de aminoácidos. Este estado puede deberse al consumo de una dieta rica en proteína, o a la ingesta de una dieta deficiente en algún aminoácido

esencial (de manera que el resto de aminoácidos superen las necesidades para la síntesis proteica corporal), o a un exceso de aminoácidos procedentes del *turnover* proteico que no pueden reciclarse en otros nuevos. La utilización de los aminoácidos para fines energéticos también puede darse en condiciones de ayuno o de salud donde no puedan usarse apropiadamente los carbohidratos (Liao y col., 2015). Sin embargo estas tasas de oxidación de aminoácidos no son iguales para todos, por ejemplo la lisina es altamente conservada (Flodin, 1997; Benevenga y Blemings, 2007).

Los 20 aminoácidos proteínogénicos se catabolizan en diferentes intermediarios metabólicos que, o bien se degradan completamente hasta formar CO_2 y ATP o intervendrán en otras rutas. De esta manera podríamos dividir a los aminoácidos en glucogénicos, siendo precursores de la glucosa; o en cetogénicos, que pueden convertirse en ácidos grasos o cuerpos cetónicos (Fig. 2.15).

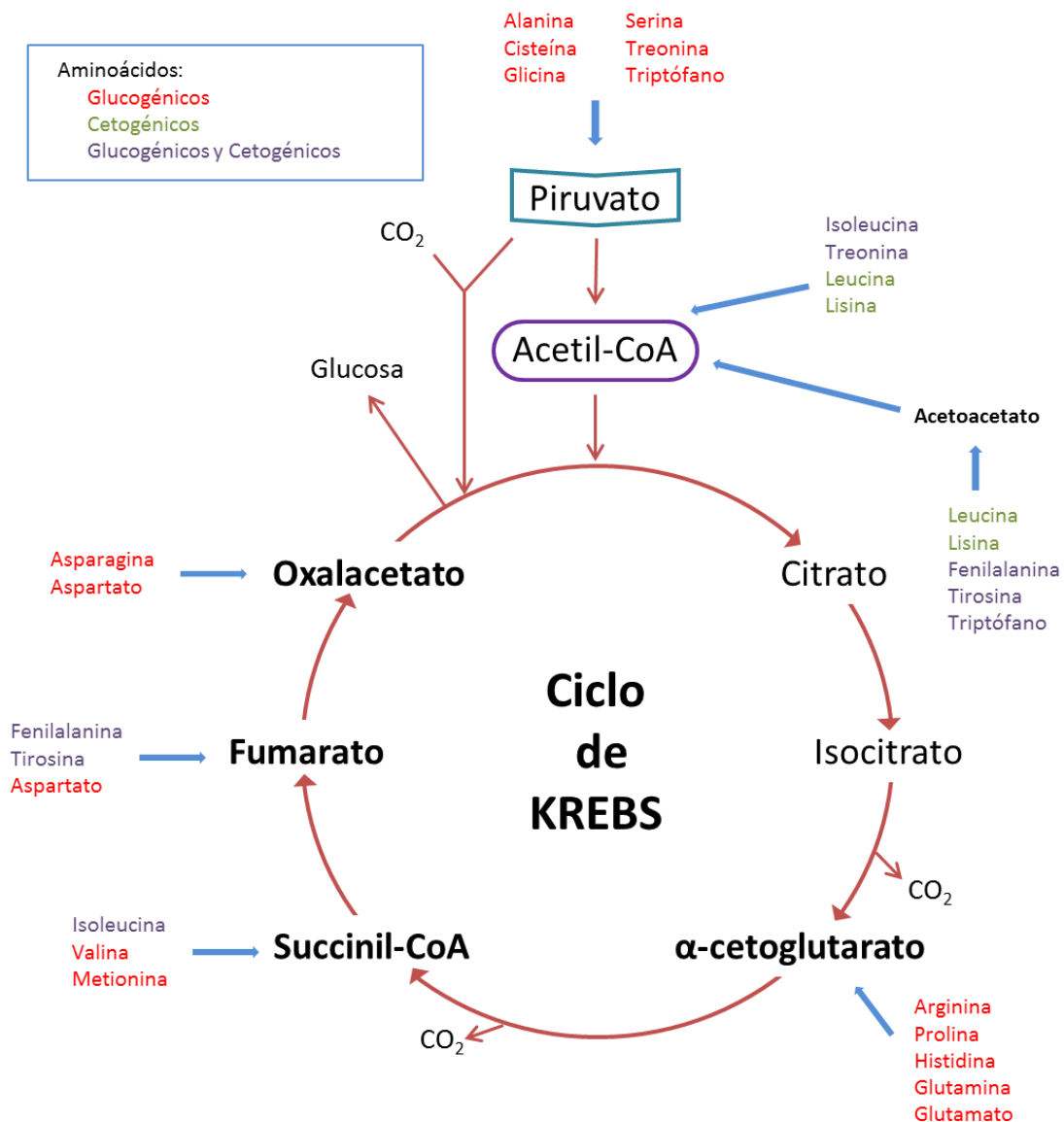


Figura 2.14 Degradación de los aminoácidos a uno de los siete intermediarios metabólicos comunes. Las degradaciones glucogénicas, cetogenicas y mixtas se indican en rojo, verde y morado, respectivamente (Voet y col., 2007)

Los aminoácidos libres resultan del catabolismo de las proteínas procedentes de la dieta y de la proteína corporal, y de otros compuestos nitrogenados que son degradados y resintetizados continuamente. El reciclaje de la proteína corporal supone un flujo de aminoácidos mucho más elevado que las cantidades que se ingieren de estos, lo que indica que la reutilización de aminoácidos es una característica importante de la economía del metabolismo de proteínas. Este proceso de recaptura no es completamente eficiente, y algunos aminoácidos se pierden por el

catabolismo oxidativo (Liao y col., 2015). Según Wolfe (1992) sólo el 20% de la proteína sintetizada procede de la ingesta proteica diaria, mientras que aproximadamente el 80% proviene del reciclado de los aminoácidos resultantes de la degradación proteica. El 20% restante del reciclado va hacia gluconeogénesis, cetogénesis u otros compuestos. Los productos metabólicos resultantes del catabolismo de aminoácidos (urea, creatinina, ácido úrico y otros productos nitrogenados) se excretan en la orina; el nitrógeno también se pierde en las heces, el sudor y otras secreciones corporales y en la piel, el pelo y las uñas desprendidas. Un suministro continuo de aminoácidos dietéticos es necesario para reemplazar estas pérdidas, incluso después de que el crecimiento haya cesado.

2.2.3 OTRAS FUNCIONES DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos pueden afectar a la expresión de diferentes genes, a la síntesis y secreción de hormonas, al metabolismo de nutrientes y defensa oxidativa, al *turnover* proteico, a la función inmune y a la reproducción. Algunas de las funciones más importantes son las siguientes:

- La glutamina, arginina, y leucina pueden afectar a los procesos de transcripción y traducción mediante la estimulación de la proteína mTOR (Meijer y Dubbelhuis, 2004; Escobar y col., 2006; Yao y col., 2008).

- La arginina es un activador alostérico de N-acetilglutamato sintasa, una enzima mitocondrial que convierte el glutamato y acetil-CoA en N-acetilglutamato, un activador alostérico de la enzima carbamoilfosfato sintasa I (Wu y Morris, 1998), implicada en el ciclo de la urea y por tanto en la detoxificación de amonio. La arginina también aumenta la expresión de proteínas y enzimas clave, como la proteína activada por AMP quinasa y la proteína 1α co-activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC- 1α) responsable de la biogénesis mitocondrial y la oxidación del sustrato, reduciendo así el exceso de masa grasa en animales obesos (Fu y col., 2005).

- La alanina inhibe la piruvato quinasa, regulando así la gluconeogénesis y la glucólisis para garantizar la producción neta de glucosa por los hepatocitos durante períodos de la privación de alimentos (Meijer, 2003).

- El glutamato y el aspartato median en la transferencia de equivalentes reductores a través de la membrana mitocondrial y así regulan glucólisis y el estado redox celular (Brosnan, 2001).

- La arginina y la fenilalanina aumentan la expresión y actividad GTP ciclohidrolasa-I, aumentando así la disponibilidad de tetrahydrobiopterina para la síntesis de NO y la hidroxilación de aminoácidos aromáticos (Shi y col., 2004).

- La glutamina regula la expresión de genes en el intestino delgado que están relacionados con la defensa oxidativa y la transducción de señales (Wang y col., 2008). Además, los niveles de glutamina disminuyen con situaciones catabólicas, lo que se asocia con un balance negativo de proteína en el músculo (Curthoys y Watford, 1995; Clowes y col., 2005), esto sugiere una posible conexión entre la concentración de este aminoácido y el *turnover* proteico. Estudios realizados en ratas a las cuales se les infundió glutamina demostraron como aumentaba la síntesis (Maclennan y col., 1987) y se inhibía la degradación (Maclennan y col., 1988) de proteína en el músculo y también en células de la mucosa del intestino delgado (Coeffier y col., 2003), evitando atrofia intestinal y mejorando el crecimiento en cerdos destetados (Wu y col., 1996).

- El H₂S producido en la degradación de la cisteína también pueden desempeñar papeles de señalización en el metabolismo de los nutrientes (estimulación de la glucosa y oxidación de ácidos grasos; Li y col., 2009).

- La metionina, la glicina, la serina y la histidina participan activamente en la metilación de proteínas y ADN, regulando así expresión génica y la actividad biológica de las proteínas.

- El glutatión, que se forma a partir de la cisteína, el glutamato y la glicina, es el principal antioxidante en las células y regula la homeostasis de radicales libres (Wu y col., 2004).

- El triptófano participa en la síntesis de serotonina, un neurotransmisor que estimula la ingesta de alimento (Naatjes y col., 2014)

- Algunos aminoácidos son precursores de hormonas y neurotransmisores. Por ejemplo, la tirosina (o fenilalanina) es el precursor para la síntesis de epinefrina, norepinefrina, dopamina y hormonas tiroideas (Newsholme y col., 2005).

Centrándonos en la lisina, este aminoácido también funciona como sustrato para la generación de moléculas no peptídicas, y metabolitos con propiedades bioquímicas y fisiológicas, esenciales en los procesos de la vida animal. A partir de la lisina, se forma la hidroxilisina que interviene en la formación de fibras de colágeno y elastina (Mienaltowski y Birk, 2014). También es precursor del glutamato, un importante neurotransmisor, cuya deficiencia puede conducir a alteraciones mentales y problemas físicos (Papes y col., 2001), y de la cadaverina, relacionada con los procesos de descomposición (Liao y col., 2015).

La carnitina es una amina sintetizada a partir de lisina y metionina y participa en el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma a la mitocondria para su β - oxidación (Fig. 2.16). Este es un mecanismo importante para la producción de ATP en tejidos sensibles a la insulina tales como músculo esquelético, corazón, hígado y tejido adiposo (Steiber y col., 2004). Además, la carnitina juega un papel en la protección de los organismos contra el estrés oxidativo, promoviendo la oxidación del sustrato en el tejido adiposo marrón y mejorando el rendimiento cardíaco (Vaz y Wanders, 2002; Ferrari y col., 2004).

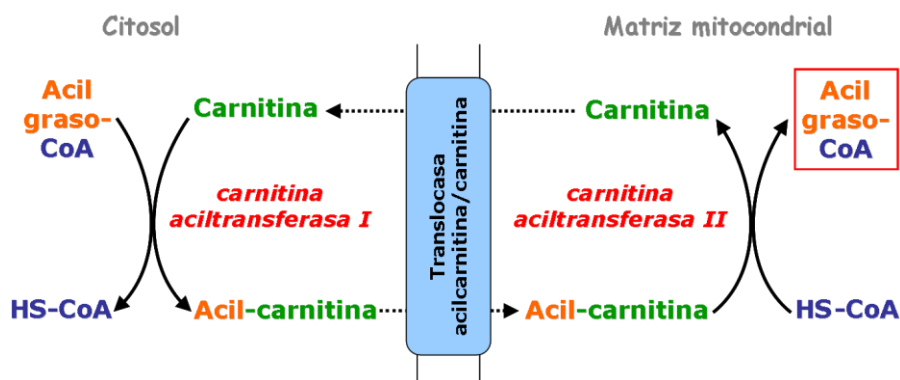


Figura 2.15 Transporte de los ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria (Voet y col., 2007; Biomodel, 2017)

La homeostasis de la carnitina es mantenida por la síntesis endógena y la absorción desde la dieta. Es distribuida por el resto de tejidos y es particularmente abundante en los músculos (Mayes, 1996). Los sustratos necesarios para su biosíntesis endógena tanto en hígado como en músculo proceden de la degradación proteica, que proporciona cantidad suficiente de precursores para su síntesis (Vaz y Wanders, 2002).

El suministro dietético de aminoácidos puede afectar a la actividad y concentración de diferentes hormonas (Takenaka y col., 2000). La deficiencia de un solo aminoácido puede perturbar las concentraciones plasmáticas de hormonas. Se ha observado como la deficiencia de lisina en la dieta reduce la concentración plasmática de IGF-1 en ratas (Takenaka y col., 2000) y en cerdos en crecimiento (Katsumata y col., 2002). Estos resultados contrastan con otros estudios con cerdos en crecimiento donde deficiencias de lisina de entre un 25 - 55% de las necesidades, no afectaban a las concentraciones de IGF-1, ni de GH e insulina (Roy y col., 2000; Ren y col., 2007). Las diferencias encontradas entre estos estudios podrían estar relacionadas con el grado de deficiencia de lisina y el número de animales empleados. Buonomo y Baile (1990) sugieren que la deficiencia de un solo aminoácido puede tener un efecto diferente en los mecanismos que regulan las concentraciones de hormonas comparado con los mecanismos que actúan ante la escasez de nutrientes. Las interacciones entre lisina y hormonas podrían conducir a una modificación de los procesos de translación o transcripción, o ambos, de la síntesis de proteína en cerdos (Ren y col., 2007), y se sabe que la suplementación de lisina a dietas deficientes mejora el crecimiento de los cerdos y el rendimiento de la producción (Shelton y col., 2011).

2.2.4 NECESIDADES EN AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNA IDEAL

En producción animal, usualmente el objetivo de la formulación de dietas es proporcionar la cantidad de aminoácidos suficiente para maximizar la retención de proteína corporal. Cantidades de aminoácidos inferiores a las necesarias conllevan una reducción del tejido magro en la canal, pero un exceso no siempre lo incrementa (Ren y col., 2007). Las necesidades de aminoácidos pueden variar según la situación

fisiológica del animal. El genotipo es uno de los factores a tener en cuenta a la hora de definir las necesidades en aminoácidos, pero otros como el peso corporal, el ritmo de crecimiento, el sexo, el estado de salud y el ambiente donde viven los animales también pueden afectar a este parámetro (Fuller, 1991 y 1994; Pettigrew y Esnaola, 2001).

La eficiencia con la que la proteína dietética es utilizada por el cerdo depende de la digestibilidad de la proteína, su composición en aminoácidos y las proporciones relativas entre ellos en relación con las necesidades del animal. Los aminoácidos en exceso se desaminarán y la urea resultante se excretará en la orina. Un exceso de aminoácidos puede resultar en un desequilibrio o antagonismo con otros aminoácidos que pueden producir efectos adversos, incluyendo la reducción de ingesta de alimento y comportamiento anormal, entre otros (Wu, 2009). Conseguir el equilibrio entre el suministro y las necesidades de aminoácidos es importante porque maximiza el crecimiento, el desarrollo y la reproducción del animal. Además, la proteína es un nutriente relativamente caro y su uso de manera ineficiente contribuye a una mayor excreción de nitrógeno al medio y al impacto negativo de la producción animal sobre la contaminación ambiental. Con la creciente disponibilidad de aminoácidos cristalinos tales como L-Lys, DL-Met, L-Thr, L-Trp y L-Val, es posible formular dietas bajas en proteína con un contenido en aminoácidos óptimo. Sin embargo, la reducción del contenido proteico en la dieta manteniendo al mismo tiempo un adecuado rendimiento, es posible sólo si existe conocimiento preciso sobre las necesidades para todos los aminoácidos (Wu, 2009; van Milgen y Dourmad, 2015).

Generalmente, para formular la composición de aminoácidos de la dieta para ganado porcino se emplea el concepto de proteína ideal. La proteína ideal es aquella que proporciona el balance perfecto de aminoácidos esenciales necesario para las funciones de mantenimiento y producción (Boisen y col., 2000). Este es un concepto muy útil para la formulación práctica de dietas, que descansa en la idea de que la composición de la proteína corporal es relativamente invariable y que los cambios en necesidades no dan lugar a modificaciones en el perfil de aminoácidos, sino a alteraciones en la cantidad total requerida de los mismos, manteniéndose constantes las relaciones entre ellos. Las necesidades para aminoácidos en la proteína ideal se expresan generalmente en relación con las necesidades de la lisina (es decir, lisina = 100%; Tabla 2.4). La lisina es el primer aminoácido limitante en las dietas basadas en cereales destinadas al ganado porcino, por lo que ha recibido una gran atención por

parte de los nutricionistas. El exceso o la deficiencia en este aminoácido pueden suponer profundos cambios en el metabolismo y en la composición corporal del animal.

En teoría, sólo se tiene que tener conocimiento del cambio en las necesidades dietéticas de lisina con el tiempo y combinar esto con un perfil ideal constante de proteína (van Milgen y Dourmad, 2015). Sin embargo, en estudios recientes se ha observado que en animales alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados se produce una alteración en la composición de la proteína corporal (Conde-Aguilera y col., 2010 y 2014). Estos cambios podrían estar relacionados con modificaciones en la proporción de proteínas corporales (actina, miosina, colágeno, etc.) que tienen distintas proporciones de aminoácidos (Chung y Baker, 1992) o al tipo y cantidad de fibras musculares (Katsumata y col., 2008).

Tabla 2.4

Proteína ideal en ganado porcino (% en relación a las necesidades en lisina digestible ileal estandarizada).

	Gestación	Lactación	Lechón 5-20 kg PV	Crecimiento 20 -100 kg PV	Acabado >100 kg PV
Lisina	100	100	100	100	100
Metionina	31	30	30	31	32
Met + Cis	66	56	59	60	61
Treonina	72	66	65	65	66
Triptófano	19	19	20	19	19
Isoleucina	60	57	54	55	56
Leucina	98	113	100	100	100
Valina	70	80	69	68	67
Histidina	35	40	32	33	34
Fenilalanina	57	56	56	60	61
Phe + Tyr	100	113	97	99	99
Arginina	72	62	42	72	43

Ref. FEDNA, 2013: basada en BSAS, 2003; FEDNA, 2006; National Swine Nutrition Guide, 2010; Evonik, 2011; Rostagno, 2011; NRC 2012; Ajimoto, 2013; Gloaguen y col., 2013; Tybirk y col., 2013.

En cerdos en crecimiento, la retención de proteína corporal es el principal factor determinante de las necesidades de aminoácidos del animal. Este proceso está

asociado íntimamente con el crecimiento en tejido magro, la eficiencia de uso del alimento y la calidad de la canal (NRC, 2012). La contribución de los distintos componentes corporales a la retención de proteína corporal total cambia con el tiempo, con un incremento de la contribución de la canal y la sangre y una disminución de las vísceras conforme al animal aumenta de peso (Mahan y Shields, 1998). A pesar de ello, algunos autores creen que si para estimar las necesidades de aminoácidos tenemos en cuenta sólo los aminoácidos depositados, estamos ignorando la función metabólica que tienen algunos de ellos. Las tasas relativas de la mayoría de aminoácidos en la dieta respecto a la cantidad de lisina difieren de las cantidades encontradas en la vena porta, en plasma o en proteínas corporales, sobre todo de aminoácidos como arginina, histidina, metionina, prolina, glutamina, glicina y serina (Wu, 2010). Es por esto que la concentración de estos aminoácidos con relación a la lisina no estiman exactamente las necesidades óptimas de los mismos en animales en crecimiento.

Para que los aminoácidos de la dieta puedan ser utilizados, primero han de sufrir los procesos de digestión y absorción. Estos procesos biológicos están influenciados con factores relacionados con el animal (genotipo, estado fisiológico y estado de salud) y el ambiente (composición de la dieta, temperatura; NRC, 2012). La proteína de la dieta no es totalmente digerida y parte de los aminoácidos no son absorbidos. Por tanto, se suelen expresar las necesidades de aminoácidos como aminoácidos digestibles. Sin embargo, el tratamiento que pueden sufrir las dietas debe ser considerado; por ejemplo, es conocido que tratar los ingredientes con algún tratamiento de calor reduce la digestibilidad de algunos aminoácidos por cambios producidos en su estructura debido a la reacción de Maillard (Moughan, 2005; Finot, 2005). Los aminoácidos son absorbidos en el intestino delgado del cerdo, y los que no son absorbidos antes de la parte distal del íleon entran al intestino grueso donde pueden ser fermentados por la microbiota. Esta fermentación puede resultar en el catabolismo y síntesis de aminoácidos cuya absorción en esta parte del tracto gastrointestinal es insignificante, por lo tanto son excretados junto a las heces. Por estos motivos, es habitual expresar los valores de aminoácidos de la dieta en función de la digestibilidad ileal (Stein y col., 2007). Además, existen pérdidas endógenas de aminoácidos debidas a la descamación de células intestinales y secreciones endógenas, que deben ser consideradas. Por tanto, se diferencian dos conceptos,

digestibilidad ileal aparente (AID) y digestibilidad ileal estandarizada (SID). Ambos términos son utilizados para expresar el contenido de aminoácidos del alimento.

$$\text{SID} = \text{AA ingeridos} - \text{AA no digeridos}$$

$$\text{AID} = \text{AA ingeridos} - \text{AA totales en íleon (AA no digeridos + pérdidas endógenas)}$$

$$\text{SID} > \text{AID}$$

El intestino delgado es uno de los principales lugares donde tiene lugar el catabolismo de aminoácidos en mamíferos (Wang y col., 2008; Swaid y col., 2013). Los enterocitos utilizan los aminoácidos para la producción de ATP, la síntesis de proteínas y para generar metabolitos que ejercen efectos fisiológicos a nivel local y en tejidos periféricos (Blachier y col., 2013). Por tanto, modula la entrada de aminoácidos de la dieta en la circulación portal y afecta al patrón de aminoácidos del plasma (Stoll y col., 1998; Wu y Morris, 1998; Riedijk y col., 2007). La oxidación intestinal de lisina representa casi un tercio de la oxidación de lisina total en el organismo de cerdos en crecimiento alimentados con dietas altas en proteína (van Goudoever y col., 2000). Parte del catabolismo de los aminoácidos podría estar relacionado con la acción de la microbiota (Fuller y Reeds, 1998). Esto podría explicar por qué la suplementación de las dietas con antibióticos o prebióticos mejora la eficiencia de utilización de los aminoácidos de la dieta para la deposición proteica y el crecimiento en cerdos (Deng y col., 2007; Kong y col., 2009).

Si nos centramos en las necesidades y las repercusiones de la concentración en lisina en la dieta, la deficiencia de este aminoácido afecta negativamente a las características de la canal y al rendimiento productivo del animal, con disminución de la ganancia diaria de peso y aumento de la relación alimento:ganancia (Roy y col., 2000; Takenaka y col., 2000). Además, el déficit de lisina en la dieta aumenta el espesor de la grasa dorsal (Bidner y col., 2004), y el contenido de grasa intramuscular (Witte y col. 2000; Katsumata y col., 2005). Por otro lado, disminuye la retención de nitrógeno (Roy y col., 2000; Ren y col., 2007), que se ve reflejado en una reducción en el área del lomo (Witte y col., 2000; Bidner y col., 2004).

2.3 METABOLISMO LIPÍDICO

Las principales clases de lípidos son triacilglicéridos, ricos en ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos monoinsaturados (AGMI); fosfolípidos, con alto contenido en ácidos grasos polinsaturados (AGPI), y colesterol. Los triacilglicéridos representan una importante reserva energética para el animal, mientras que los fosfolípidos son los principales constituyentes de las membranas celulares. En el animal podemos diferenciar cuatro grandes depósitos grasos: la grasa dorsal o subcutánea, la grasa visceral y la grasa inter e intramuscular (Gerbens, 2004). Los que más interés generan son, la grasa dorsal, ya que representa una proporción importante de la canal; y la grasa intramuscular (GIM) por su estrecha relación con las propiedades organolépticas y la calidad de la carne. La deposición de grasa entre los diferentes depósitos grasos difiere tanto en cantidad como en origen. Por ejemplo, en cerdos Large-White y de la raza Meishan, la grasa depositada en el cuello procede fundamentalmente de los ácidos grasos de la dieta, mientras que en otras zonas como el tejido adiposo dorsal proceden mayoritariamente de la síntesis endógena (Mourot y col., 1995 y 1996). La deposición directa de ácidos grasos dependerá de ciertos factores como la digestión, la absorción (los ácidos grasos libres se absorben peor que los triacilglicéridos), el transporte, el tipo de lípido, el nivel de ingesta y la edad. El cerdo, al ser un animal monogástrico, modifica escasamente durante la digestión los ácidos grasos de la dieta, de tal manera que su perfil en la grasa y carne es mayoritariamente reflejo de su alimentación.

La carne de cerdo tiene mayor proporción del principal ácido graso esencial, el linoleico (18:2 n-6), que la de ovejas o vacas (Enser y col., 1996). El ácido linoleico junto al linolénico (18:3 n-3) son ácidos grasos esenciales que proceden exclusivamente de la dieta. En cerdos, estos ácidos grasos pasan por el estómago sin sufrir modificaciones, son absorbidos hacia el torrente sanguíneo en el intestino delgado e incorporados en los tejidos. Los AGPI de cadena larga son formados a partir de estos dos ácidos grasos por la acción de las enzimas desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ y las elongasas. Entre ellos destacan el ácido araquidónico (20:4 n-6) y ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3), que tienen importantes funciones metabólicas (Wood y col., 2008).

2.3.1 BIOSÍNTESIS

Los depósitos grasos del animal son el resultado del balance existente entre el aporte de ácidos grasos procedentes del alimento, la síntesis endógena, y la β -oxidación (Hocquette y col., 2010). Gran parte del depósito de grasa en el cerdo se produce por acumulación directa de los ácidos grasos de la dieta. No obstante, debido a que las dietas tradicionales para la alimentación de ganado porcino tienen poca grasa, y están formadas principalmente por cereales (ricos en almidón), la síntesis *de novo* de ácidos grasos generalmente se debe al catabolismo de la glucosa, que es degradado a piruvato por la vía de la glucólisis anaeróbica en el citoplasma (O'Hea y Leveille, 1969). La síntesis *de novo* de ácidos grasos representa alrededor del 86% del total de ácidos grasos no esenciales depositados en cerdos en crecimiento (Kloareg y col., 2007) y es considerada bastante constante. Aproximadamente el 45% de los ácidos grasos sintetizados son saturados y el 55% monoinsaturados (Brook, 1971). La lipogénesis *de novo* corresponde a la síntesis *in situ* de los ácidos grasos a partir de diversos precursores de cadenas carbonadas y su esterificación con glicerol para formar triacilglicéridos o grasas de reserva en el citoplasma celular. La biosíntesis de los ácidos grasos ocurre en el citoplasma de hepatocitos y adipocitos, siendo el hígado y el tejido adiposo los sitios preferentes para la lipogénesis *de novo*, este último con más importancia relativa en el cerdo. Pero también se ha demostrado que existe lipogénesis *de novo* a nivel muscular.

Las principales enzimas implicadas en la lipogénesis son (Fig. 2.16):

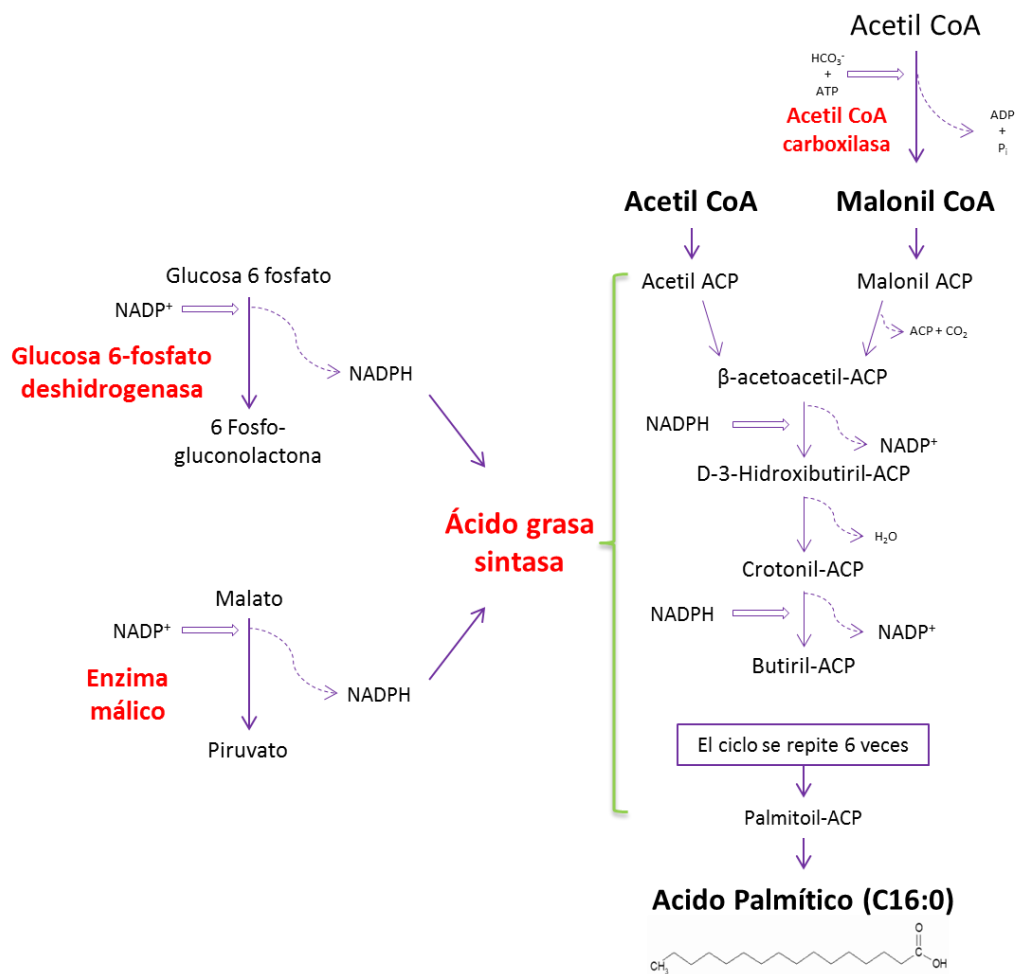


Figura 2.16 Biosíntesis de ácidos grasos y principales enzimas implicadas (Voet y col., 2007).

Acetil coenzima A carboxilasa: Esta enzima cataliza el primer paso de la biosíntesis de los ácidos grasos. Condensa una molécula de acetil coenzima A (CoA) y CO₂ para formar malonil-CoA.

Ácido graso sintasa: Se considera un buen indicador de la síntesis *de novo*. Esta enzima o más exactamente este complejo enzimático (7 subunidades que catalizan 6 ciclos de reacciones sucesivas) sintetiza el ácido palmítico a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH y energía. Este sería el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos, ya que a partir del ácido palmítico, se sintetizarán el resto de ácidos grasos insaturados y saturados de cadena más larga mediante la acción de las enzimas elongasas y desaturasas, con excepción de los ácidos grasos esenciales linoleico y linoléico (Fig. 2.17).

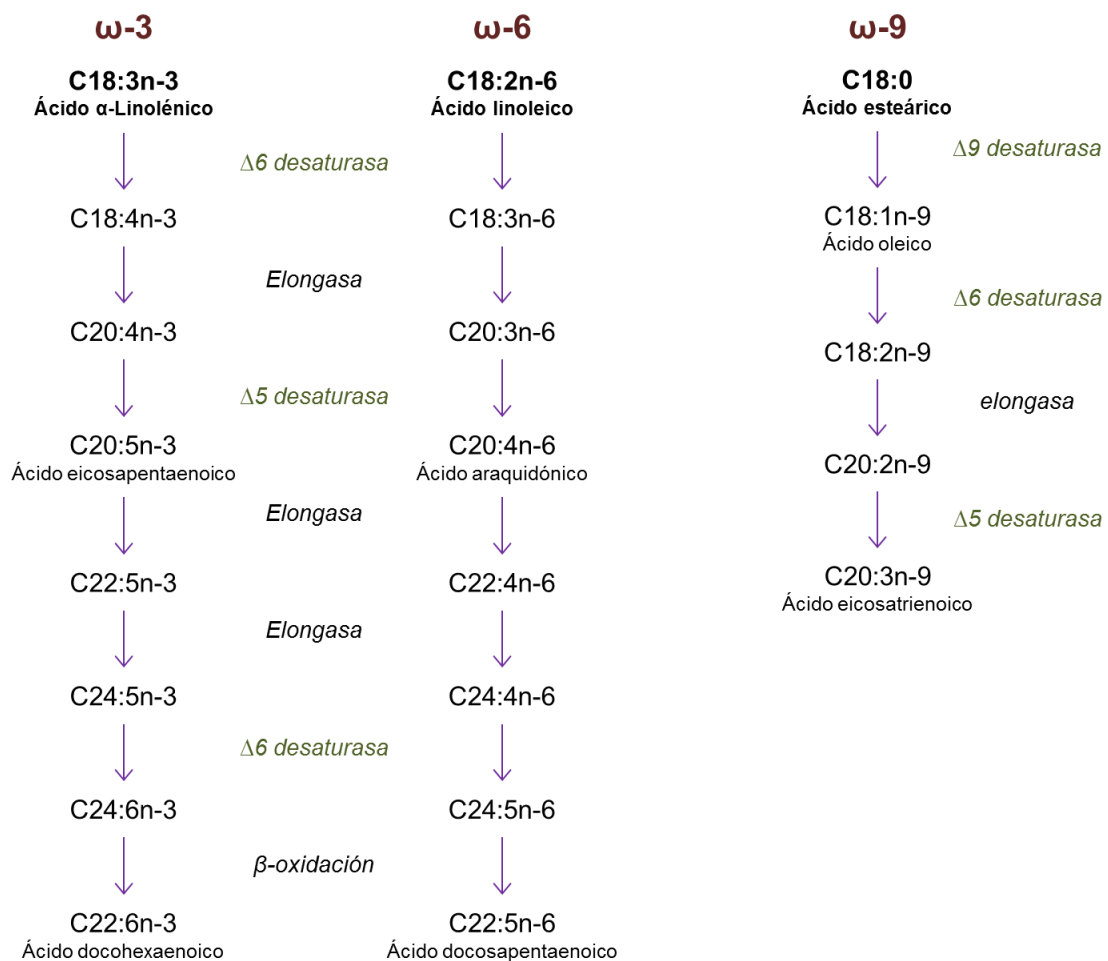


Figura 2.17 Vía de elongación y desaturación del ácido esteárico, el ácido linoleico y el ácido α -linoléico (Kelley, 2001).

El acetil-CoA utilizado puede ser aportado por diferentes vías. En animales monogástricos el principal carbohidrato aportado por la dieta es la glucosa, por lo que

será este el principal precursor de acetil-CoA. Predomina por tanto la vía glucolítica y las enzimas relacionadas con este proceso como la enzima málica.

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y Enzima málica: Estas enzimas aportan las moléculas NADPH necesarias para la actividad de la enzima ácido graso sintasa. La primera participa en la ruta de las pentosas fosfato e interviene en la oxidación de la glucosa, y la segunda enzima convierte el malato en piruvato. Esta última presenta más actividad en monogástricos. Existe una tercera enzima que aporta NADPH que es la isocitrato deshidrogenasa, que convierte el isocitrato en cetoglutarato, siendo especialmente activa en rumiantes.

Algunos estudios consideran a la enzima málica como un buen indicador de la actividad lipogénica en músculo, encontrando relación entre el aumento de actividad y el aumento de grasa intramuscular (Mourot y Kouba, 1998).

Estearoil-CoA desaturasa (SCD): esta enzima interviene en la formación de dobles enlaces en las cadenas de los ácidos grasos (Fig. 2.18). Se conocen 4 tipos de desaturasas: $\Delta 9$ -acil- CoA, $\Delta 6$ -acil- CoA, $\Delta 5$ -acil- CoA y $\Delta 4$ -acil- CoA.

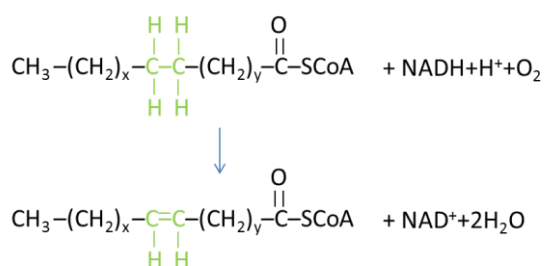


Figura 2.18 Formación de dobles enlaces por medio de enzimas desaturasas (Voet y col., 2007).

En ocasiones en las que no se mide directamente la actividad de $\Delta 9$ -SCD, se suele utilizar el índice de desaturación de los ácidos grasos C16:1/C16:0 y C18:1/C18:0. Aunque este índice estima la actividad SCD, no es un buen indicador del mismo, debido en parte a la existencia de un intervalo de tiempo entre los cambios

debidos a la enzima desaturasa y los cambios en los índices (Hsieh y Kuo, 2005). Se ha demostrado previamente que la expresión de enzimas lipogénicas, principalmente $\Delta 9$ -SCD, tiene un impacto muy importante sobre la deposición de la grasa intramuscular en cerdos (Doran y col., 2006).

Existen otras enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, como la lipoproteína lipasa (LPL) que hidroliza los triacilglicéridos en glicerol y ácidos grasos; la proteína de unión 4 de ácidos grasos (FABP4), responsable del transporte de ácidos grasos en los adipocitos (Hocquette y col., 2010); la carnitina O-acetiltransferasa que es la enzima limitante de la velocidad del catabolismo de los lípidos, transportando ésteres de ácidos grasos del citosol a las mitocondrias para su β -oxidación; y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (α -PPAR) que es un importante inductor de la oxidación de ácidos grasos (Poulsen y col., 2012). También se sabe que los factores de transcripción como la proteína de unión al elemento regulador del estero1 (SREBP1), las proteínas de unión al potenciador CCAAT (CEBPA) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (γ -PPAR), están involucrados en el control del metabolismo de lípidos en el tejido adiposo a través de la regulación de la expresión de enzimas clave y de las proteínas que controlan la adipogénesis y la lipogénesis (Hocquette y col., 2010). Estas enzimas pueden verse afectadas por el genotipo y el estatus nutricional. Para algunos autores el genotipo es el principal factor que influye en la actividad de estas enzimas, mientras que el tratamiento nutricional tendría un papel secundario (Morales y col., 2002).

Factores que afectan a la actividad de enzimas lipogénicas

Genotipo

En general, se ha encontrado mayor actividad de síntesis lipídica en razas porcinas con tendencia grasa. En este sentido Freire y col. (1998) determinaron mayor actividad lipogénica de las enzimas málica, acetil-CoA carboxilasa y G6PDH en grasa dorsal y perirenal de lechones Alentejanos respecto a lechones Large-White a los 48 días de edad, lo que concuerda con los resultados encontrados por Mourot y Kouba (1998 y 1999) en diferentes tejidos y etapas del ciclo productivo de otra raza grasa obesa como la Meishan al ser comparada con cerdos Large-White. En otro estudio comparado (Morales y col., 2002) entre la raza Ibérica y la Landrace, en fase de

acabado, la actividad de la enzima málica fue superior en los músculos *semimembranosus* y *gluteus* y en la grasa subcutánea de cerdos Ibéricos. En cambio, en otras zonas anatómicas estas diferencias entre la actividad lipídica debidas al genotipo se atenúan conforme el animal crece llegando incluso a invertirse (Mourot y Kouba, 1999). Sin embargo, otros autores (Madeira y col., 2013a) no encontraron diferencias significativas debidas al genotipo sobre la expresión de genes de enzimas lipogénicas, tales como la acetil-CoA carboxilasa, la ácido graso sintasa, y la esteroil-CoA desaturasa en cerdos Alentejanos y Large-White × Landrace × Pietrain, de 93 kilos.

Edad

En general, el mayor potencial de lipogénesis en cerdos ocurre a una edad temprana y disminuye conforme crece el animal. De acuerdo con trabajos de Mourot y Kouba (1998 y 1999), en cerdos Large-White, la enzima acetil-CoA carboxilasa presentó su máxima actividad a los 40 kg en piezas como jamón y paleta, y en la grasa intramuscular del músculo *Semimembranosus*, mientras que en la raza Meishan el mayor potencial lipogénico se presentó a los 20 Kg. Por otro lado, la actividad de las enzimas málica y G6PDH tendió a disminuir conforme el peso del animal aumentaba. Resultados similares se encontraron en depósitos grasos de diferentes localizaciones del cuerpo del animal como el cuello, la grasa dorsal, la panceta y la grasa interna (Mourot y col., 1996).

Dieta

Doran y col. (2006) y da Costa y col. (2004) mostraron cómo dietas bajas en proteína incrementaban la expresión de la esteroil-CoA desaturasa en *Longissimus dorsi* y *Psoas major*, y que existía una correlación lineal entre la expresión de la esteroil-CoA desaturasa y el contenido en grasa intramuscular y en ácido oleico (Doran y col., 2006). Estos resultados contrastan con trabajos en los que se describe que dietas deficientes en proteína y/o en lisina no afectan ni a la expresión, ni a la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis lipídica (Madeira y col., 2013, Hernández-Matamoros, 2014) en la grasa dorsal y en el músculo.

Tejido

Como hemos mencionado anteriormente, el tejido adiposo es el principal responsable de la lipogénesis en el cerdo (O’Hea y Leveille, 1969). No es de extrañar que sea la grasa dorsal el tejido que presenta mayor capacidad de síntesis lipídica, comparado con otras localizaciones anatómicas como músculo o hígado (Mourot y Kouba, 1999; Azain, 2004; Gondret y col., 2005). En músculo, la principal enzima que aporta NADPH es la enzima málica. Es probable que en músculo predomine una mayor actividad del ciclo de Krebs, lo que lo haría menos sensible a las variaciones de la glucosa periférica comparado con la grasa dorsal (Martínez-Puig y col., 2006). Aunque existe relación entre la grasa intramuscular y la actividad sintética de ácidos grasos, existen algunos trabajos que describen que una mayor concentración de grasa no va acompañada por un incremento de síntesis (Morcuende y col., 2007; Hernández-Matamoros, 2014), lo que puede ser debido a que no toda la grasa en el músculo es producida *in situ* sino que también procede de otras localizaciones. Esta hipótesis es consistente con hallazgos de Mourot y col. (1995) que encontraron que el tejido adiposo subcutáneo en porcino es heterogéneo, con ciertas localizaciones que exhiben una lipogénesis muy baja y, paradójicamente, una alta deposición de lípidos como resultado de la importación de triacilglicéridos de otras zonas de alta actividad lipogénica.

Así, se ha observado que los adipocitos musculares tienen preferencia por el uso de la glucosa para la síntesis lipídica, mientras que los adipocitos de la grasa subcutánea utilizan principalmente ácidos grasos durante la lipogénesis (Wang y col., 2013). Por último, se ha descrito que los adipocitos localizados en el depósito subcutáneo acumulan más lípidos y de forma más rápida que los adipocitos musculares (Zhou y col., 2010; Kouba y Mourot, 2011).

Por otro lado, los distintos depósitos grasos pueden verse afectados de manera diferente por factores externos como la dieta. Por ejemplo, una dieta baja en proteína aumentó la expresión génica y la actividad de la enzima SCD en la grasa intramuscular pero no en el tejido adiposo subcutáneo de cerdos cruzados Duroc × Large-White × Landrace (Doran y col., 2006). En contraste, Castellano y col. (2015) encontraron en cerdos Pietrain × (Large-White × Landrace) alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados, un mayor contenido de grasa subcutánea junto a un

incremento de la actividad de enzimas lipogénicas en este tejido, mientras que no observó diferencias en el músculo *Longissimus dorsi*.

2.3.2 LIPOLISIS Y β – OXIDACIÓN

La lipasa es la enzima encargada de la rotura de los triacilglicéridos para liberar ácidos grasos al torrente sanguíneo que son, posteriormente, transportados hacia la célula. Esta es la primera etapa en la degradación y movilización de los lípidos. Aquellos ácidos grasos que vayan a ser utilizados para la obtención de energía por parte de la célula, utilizarán el sistema de transporte de la carnitina, en el caso de los ácidos grasos de cadena larga, mientras que los de cadena corta entrarán directamente a la mitocondria para la β - oxidación.

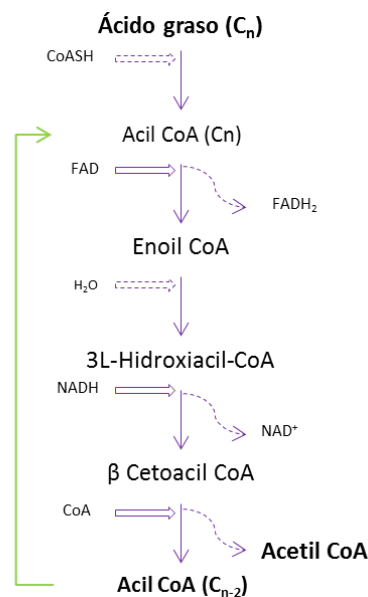


Figura 2.19 La vía de β – Oxidación del acil-CoA graso

Estudios realizados con cerdos cruzados (Landrace \times Large White \times Duroc) de 110 kg sometidos a una dieta baja en lisina, mostraron que los animales alimentados con dietas deficientes en lisina presentaban mayor cantidad de grasa intramuscular y menores niveles de carnitina; se sugiere así, que la restricción en lisina – uno de los

precursores para la formación de carnitina-, da como resultado a una menor formación de esta molécula y por tanto menor tasa de degradación de ácidos grasos que contribuirían al mayor depósito de grasa (Katsumata y col., 2005). Según algunos autores, la suplementación con carnitina a la dieta puede reducir la grasa de la canal en cerdos (Heo y col., 2000; Owen y col., 2001). Sin embargo, en otros estudios realizados en cerdos en crecimiento (Fischer y col., 2009), la concentración de carnitina y de algunos de sus derivados se redujo con la suplementación de lisina por encima de los valores estimados como necesarios (1,7 vs 0,97%).

2.3.3 GRASA DORSAL E INTRAMUSCULAR

La cantidad de lípidos en la carne influye tanto en la aptitud tecnológica para los productos procesados, como en la calidad sensorial y nutricional de los productos obtenidos (Gandemer, 2002). Normalmente, la cantidad de tejido adiposo aumenta conforme el animal crece. Dicho aumento es debido, mayoritariamente, al aumento del tamaño de los adipocitos que se llenan de lípidos con la edad (Peter y Smith, 1997).

2.3.3.1 GRASA DORSAL

En general, la industria de carne fresca prefiere canales más magras, mientras que la industria de productos curados prefiere canales con mayor contenido de grasa. En este sentido la industria de productos curados prefiere un grosor de tocino dorsal de alrededor de 20 mm y un contenido en ácido linoleico (18:2n6) menor del 15% (Latorre y col., 2008 y 2009). Por ejemplo, la regulación de denominación de origen del jamón de Teruel (BOE-A-1993-19267), establece que el grosor de grasa dorsal a nivel del músculo *Gluteus medius* sea como mínimo de 18 mm a fin de mejorar la uniformidad y calidad del producto final. Para los productos curados, una alta adiposidad conlleva una captación de sal moderada que atenúa la salinidad, para que

la sal no interfiera en el desarrollo y la percepción del sabor y el aroma. Además permite una deshidratación lenta al actuar la grasa como barrera.

La medición del espesor de la grasa dorsal, sobre todo a nivel de P2 (a 6,5 cm de la línea media al nivel de la última costilla), es considerado como un método objetivo y preciso para evaluar la composición del animal, particularmente en cerdas (Maes y col., 2004). Mullan y Williams (1990) han mostrado que la medición de la grasa dorsal y el peso corporal pueden ser usados para predecir la cantidad total de lípidos en el cuerpo. Estimaciones similares se han hecho también en el cerdo Ibérico a partir del espesor de grasa dorsal, el peso corporal y la longitud de la canal (Nieto y col., 2013). Las mediciones de la grasa dorsal también pueden usarse como una herramienta para evaluar el bienestar animal, detectando animales gravemente desnutridos o sobrealimentados (Barnett y col., 2001).

Además, la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea es utilizada como un indicador de los rasgos de calidad más relevantes en los productos curados, tales como la consistencia de la grasa, el aroma y el sabor, y los aspectos nutricionales de dichos productos (Ventanas y col., 2006).

2.3.3.2 GRASA INTRAMUSCULAR

La grasa intramuscular (GIM) es el total de lípidos que encontramos en las fibras musculares y está formada principalmente por fosfolípidos, triacilglicéridos, mono- y diacilglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, y ácidos grasos libres (Hocquette y col., 2010). Los fosfolípidos y los triacilglicéridos son los principales constituyentes de la GIM mientras que la contribución de los otros lípidos es solo marginal. La GIM puede apreciarse en formas de vetas, más o menos finas que se entrecruzan con el magro y juega un papel decisivo tanto en aspectos tecnológicos del procesado como en las características sensoriales y nutricionales de la carne (Ventanas y col., 2005). Este depósito graso es tan importante que está incluida como criterio de selección en la asociación de criadores del cerdo Ibérico (AECERIBER, 2007).

2.3.3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Es de gran importancia el perfil de ácidos grasos del tejido adiposo ya que, entre otras características, afecta a la firmeza, debido a que los ácidos grasos tienen diferentes puntos de fusión. El punto de fusión de los ácidos grasos va desde los 25 °C a los 50 °C, los valores más altos pertenecen a los ácidos grasos saturados mientras que los puntos más bajos son característicos de los ácidos grasos poliinsaturados (Wood y col., 2008).

2.3.3.4 FACTORES QUE AFECTAN A LOS DEPÓSITOS LIPÍDICOS Y A SU COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS

El perfil de ácidos grasos en la carne puede verse influenciado por la cantidad de grasa y la síntesis endógena de ácidos grasos (Ramírez y Cava, 2007). Conforme aumenta el contenido de grasa en el animal y en los músculos, las proporciones de ácidos grasos se modifican. Por ejemplo, en el tejido adiposo subcutáneo de cerdo, aumenta la proporción de los ácidos grasos 18:0 y 18:1 y disminuye la de los ácidos grasos esenciales. Esto se atribuye al efecto de dilución que tiene lugar al aumentar la síntesis *de novo* de lípidos saturados y monoinsaturados en los tejidos, mientras la incorporación directa de los ácidos grasos esenciales (más rápida en el caso del 18:2 n-6 que el 18:3 n-3) se mantiene en aproximadamente las mismas condiciones, pero con proporciones que disminuyen (Kouba y col., 2003). Existe, por tanto, una relación inversa entre la proporción de ácidos grasos esenciales y el contenido en grasa. Generalmente un incremento en el contenido de grasa intramuscular se debe principalmente al incremento en triacilglicéridos (Cameron y Enser, 1991; Fernandez y col., 1999).

En cerdos, las diferencias en la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea entre canales de diferentes espesores de grasa a nivel P2, tienen un efecto importante en la calidad de la grasa en términos de firmeza y grado de cohesión entre los tejidos magros y grasos. Conforme el espesor incrementa, aumenta

la proporción de 18:1 y se reduce la de 18:2 n-6 y, en consecuencia, se incrementa también la firmeza de la grasa (Wood y col., 2008).

Genotipo

De acuerdo con Pugliese y Sirtori (2012) las razas porcinas nativas europeas, presentan en general mayor cantidad de grasa intramuscular que las razas mejoradas (3-10% vs 1% aproximadamente), y tienen una mayor predisposición a depositar AGMI, principalmente 18:1, mientras que los cerdos de alto rendimiento muestran cantidades de AGS superiores. Por ejemplo, la raza Alentejana presenta un contenido en grasa intramuscular superior al de genotipos mejorados, con altas proporciones de AGS y AGMI. Otros estudios con animales en fase de acabado encontraron un 4,19% de GIM en músculo *Biceps femoris* de Ibéricos puros (Ventanas y col., 2006) frente al 2,2% que presentan los músculos de razas magras (Lebret y col., 2011). Por otro lado, la raza Duroc y las razas blancas tienen cantidades similares de grasa subcutánea, pero en Duroc es mayor la proporción de grasa intramuscular (Candek-Potokar y col., 2002).

Edad

Como mencionamos en el apartado 2 (Fig. 2.9 y 2.10), el porcentaje de grasa corporal respecto al peso total aumenta conforme lo hace el peso del animal. Conforme éste avanza en edad el crecimiento del tejido graso es superior al del tejido magro en la canal.

Los lechones recién nacidos no tienen capacidad de sintetizar grasa a partir de carbohidratos, el engrasamiento en esta etapa de su vida tiene lugar por depósito directo de la grasa de la leche materna, conforme crecen se van activando las enzimas responsables de la lipogénesis. Esta activación puede venir dada por el cambio de dieta o por inducción hormonal de la insulina (Lakshmanan y col., 1972). El desarrollo celular del tejido adiposo tiene lugar en 3 fases: la hiperplasia (7 - 20 kg), hiperplasia e hipertrofia (20 – 70 kg) e hipertrofia (> 70 kg) (Hauser y col., 1997). Así que durante el crecimiento el mayor desarrollo de tejido graso se debe al llenado del adipocito. Hauser y col. (1997) evidenciaron la correlación entre el peso vivo del animal y la

evolución del diámetro de los adipocitos en diferentes depósitos grasos. Mourot y col. (1996) observaron que la capacidad lipogénica del tejido graso aumenta con la edad hasta un máximo a los 4 ó 5 meses aunque esto dependerá de la raza. Estos autores también determinaron que los cerdos Meishan expresaban su máximo potencial de síntesis de grasa a los 20 kg mientras que LDW no lo hacía hasta los 40 - 60 kg. Pero esta evolución en el engrasamiento no es igual en todos los tejidos, por ejemplo en Duroc la grasa de *Longissimus* aumentaba linealmente con la edad pero el espesor en la grasa dorsal disminuía. De entre los distintos depósitos de grasa que presenta el animal, la grasa intramuscular es la última en desarrollarse (Hauser y col., 1997; Bosch y col., 2012).

A medida que se desarrolla la grasa dorsal subcutánea en la canal, aumenta la proporción de ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo que surgen de la síntesis *de novo*, específicamente AGS y AGMI, y el contenido de AGPI disminuye, ya que la proporción de AGPI suministrada por los lípidos dietéticos es menor (Gandemer, 2002).

Tejido

En cerdos, como en cualquier otro animal, el tejido adiposo subcutáneo presenta mayor concentración de lípidos que el músculo; ambos tejidos presentan mayores proporciones de AGPI que otros animales como ovejas y vacas (Enser y col., 1996). Las proporciones n-6/n-3 también son más altas en los tejidos del cerdo, siendo mayores que las aconsejadas para consumo humano (< 4, Scollan y col., 2006).

En el tejido adiposo, el principal tipo de lípido es el triacilglicerol o lípidos neutrales. El músculo tiene una cantidad significativa de fosfolípidos, que están compuestos mayormente por AGPI, a fin de realizar su función como constituyente de las membranas celulares (Wood y col., 2008). En general también hay más cantidad de AGPI en tejido subcutáneo que en la GIM (Teye y col., 2006). El mayor contenido en AGPI del músculo *Biceps femoris* (intermedio oxidativo) podría ser debido al diferente patrón metabólico respecto a *Longissimus dorsi* (mayoritariamente glicolítico) (Leseigneur-Meynier y Gandemer, 1991). El contenido más alto de AGPI en los músculos oxidativos respecto a los glicolíticos es una consecuencia de su abundancia en membranas ricas en fosfolípidos (compuestos principalmente por AGPI).

Además, el desarrollo de la grasa en el músculo es más tardío que el de las células grasas subcutáneas (que se diferencian en la etapa fetal) y se mantiene activo en animales jóvenes (Gondret y col., 2008). Probablemente, puede responder a condiciones de alimentación de una forma diferente a otros depósitos grasos (Gondret y Lebret, 2002). Por ejemplo, cerdos del tipo convencional (Duroc × Large-White × Landrace) sufrieron un gran aumento en el contenido de grasa en el músculo (40%), con sólo un pequeño incremento en la proporción de grasa dorsal (4%) cuando se alimentaron con dietas deficientes en proteína y lisina (Gondret y Lebret, 2002). Como mencionamos anteriormente, los mecanismos implicados en el desarrollo del contenido graso del animal difieren entre las distintas localizaciones anatómicas.

Dieta

Es bien sabido que en los animales monogástricos, la concentración lipídica y su composición en ácidos grasos puede ser fuertemente influenciada por factores dietéticos. Sin embargo, las estrategias nutricionales basadas en la modificación del contenido de macronutrientes han demostrado tener un efecto menor en la grasa intramuscular que en la subcutánea (Suarez-Belloch y col., 2013) lo que frecuentemente se traduce en canales con exceso de grasa dorsal. Esto probablemente se debe a que este tipo de dietas estimulan la lipogénesis, es decir, la acumulación lipídica en los adipocitos maduros presentes. Debido a la mayor concentración de adipocitos en la grasa subcutánea, parece lógico que éste sea el principal depósito afectado.

El aumento en la concentración de grasa de la dieta disminuye la síntesis de grasa de *novo* en cerdos (Azain, 2004). Animales del genotipo Ibérico criados en extensivo en zonas de dehesa y alimentados con bellota (deficientes en proteína y lisina, y ricas en AGMI) presentan un perfil en la grasa rico en oleico, y en AGMI en general, y en linolénico (Andrés y col., 2001; Tejerina y col., 2012). Aun así, el impacto es moderado sobre los ácidos grasos C16 y C18 y los monoinsaturados, ya que son principalmente productos de la biosíntesis en el animal y sus interconversiones (Wood y col., 2008). Estudios como los de Enser y col. (2000) demostraron que animales alimentados con dietas ricas en ácido linolénico (18:3 n-3) reducían considerablemente la tasa de n-6/n-3 por un aumento en AGPI de tipo n-3, junto la reducción de n-6, ya que ambos tipos de ácidos grasos compiten por las mismas

enzimas desaturasas y por su incorporación a los lípidos. En general, las dietas para ganado porcino son bajas en grasa, y el perfil de ácidos grasos en el organismo es dominado por la síntesis de *novo*. Esto resulta en un declive en la relación de AGPI:AGS con el aumento de la deposición de grasa.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que dietas bajas en proteína o en algún aminoácido esencial provocan un incremento en la deposición de lípidos. En dichas dietas, donde la cantidad de aminoácidos no cubre las necesidades del animal, la limitación en la síntesis de proteína permite mayor disponibilidad de energía para ser utilizada en otras rutas metabólicas (Wood y col., 2004; Katsumata y col., 2005; Teye y col., 2006; Conde-Aguilera y col., 2010). En esta misma línea, estudios realizados con dietas deficientes en proteína (18 vs 20% PB) y el mismo contenido energético incrementaron la concentración lipídica en *Longissimus dorsi* (Teye y col., 2006), con un incremento de la proporción de ácido oleico y una disminución de las proporciones de todos los AGPI. En otro estudio similar (Doran y col., 2006), dietas reducidas en proteína resultaron en un aumento de la expresión y la actividad de la enzima estearoil-CoA desaturasa en *Longissimus (thoracis y lumborum)* que se relacionó con mayores cantidades de GIM y de ácido oleico. En este mismo estudio, el gran aumento (86,6%) en GIM debido a la restricción de proteína dietética fue acompañado por un aumento (8,5%) de los lípidos del tejido adiposo subcutáneo, lo cual está en línea con otros trabajos que también muestran que la formación de grasa intramuscular no sigue el mismo patrón que la grasa de la canal (Wood y col., 2004) y de la grasa dorsal (Castell y col., 1994; Gondret y Lebret, 2002) con dietas restringidas en proteína.

El estudio de Madeira y col. (2013b) demostró que dietas reducidas en proteína aumentaban el nivel de C16:0 y las proporciones de AGS, y reducían las proporciones de AGPI en el músculo *longissimus lumborum* de cerdos grasos y magros. En dietas deficientes en algún aminoácido esencial, el incremento de GMI puede ser resultado del mayor catabolismo oxidativo de los aminoácidos que no pueden ser utilizados en la formación de proteína, ya que necesitan más cantidad de glucosa para la transcripción (Morales y col., 2002).

Por otro lado, Katsumata y col. (2005) encontraron que la aplicación de una dieta deficiente en un sólo aminoácido esencial como la lisina, en cerdos en crecimiento, induce una serie de cambios relacionados con el metabolismo energético

y la adipogénesis en el músculo. Estos cambios, que dan lugar a un mayor depósito de GIM, son el aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT 4 y del receptor activado de proliferador de peroxisomas γ (PPAR- γ) (Katsumata y col., 2002 y 2008).

2.4 EL TEJIDO MUSCULAR

El crecimiento y desarrollo del músculo esquelético es uno de los objetivos más importantes en nutrición animal, por la importancia productiva de este tejido. El músculo está formado por células adiposas, tejido conectivo, fibras nerviosas y musculares y la red capilar. El principal componente del músculo son las fibras musculares. La masa muscular en gran medida está determinada por el número de fibras y su tamaño (Rehfeldt y col., 2004).

2.4.1 FIBRAS MUSCULARES

La fibra muscular o miocito es una célula fusiforme y multinucleada con capacidad contráctil. La membrana celular se denomina sarcolema y el citoplasma sarcoplasma (Fig. 2.20). Contiene orgánulos celulares, núcleos celulares, mioglobina y un complejo entramado proteico de diferentes isoformas de miofibras constituidas por moléculas de actina y miosina cuya principal propiedad, la contractilidad, es la de acortar su propia longitud cuando son sometidas a un estímulo físico, químico, eléctrico o mecánico (Reggiani y Mascarello, 2004). Las fibras exhiben diferencias en cuanto a sus propiedades contráctiles y bioquímicas, contribuyendo a la diversidad estructural y funcional de los músculos (Listrat y col., 2016).

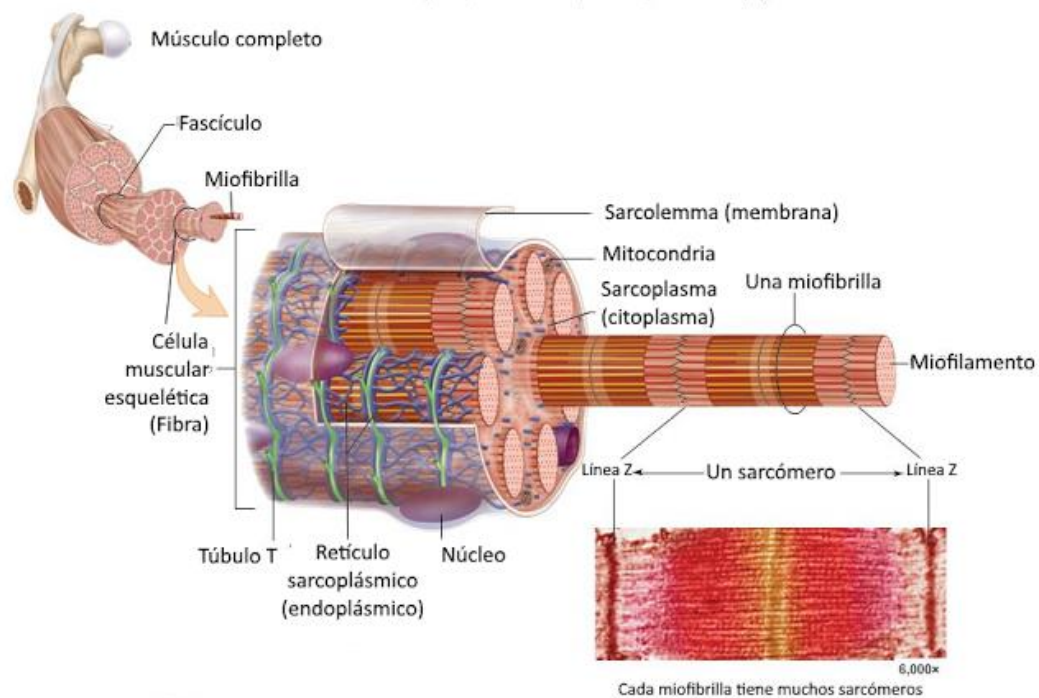


Figura 2.20 Organización general del músculo esquelético (Blogia 2.0, 2017).

Las características contráctiles y metabólicas de las fibras dependen principalmente de la cadena pesada de miosina (MyHC) presente dentro de los filamentos gruesos que forman las miofibrillas. En los músculos esqueléticos se diferencian 4 isoformas de estas cadenas de miosina: I, IIa, IIx y IIb. La actividad ATPasa de estas cadenas está relacionada con la velocidad de contracción: lentas (tipo I) y rápidas (tipos IIa, IIx y IIb). Por otro lado, en los músculos existen dos rutas metabólicas por las que se genera ATP: una ruta oxidativa (aeróbica) por la cual el piruvato es oxidado por la mitocondria; y una ruta glucolítica (anaerobia) donde el piruvato es convertido a ácido láctico en el sarcoplasma.

Las **Fibras Tipo I** (también llamadas lentas u oxidativas) presentan gran cantidad de mioglobina (cuya función es almacenar oxígeno en la fibra muscular), menor número de miofibrillas y un sarcoplasma abundante. Su metabolismo es fundamentalmente aeróbico, poseen una rica capilarización, mayor cantidad de mitocondrias por unidad de área y mayor presencia de todas las enzimas claves del metabolismo aeróbico. Son de contracción lenta pero resistentes a la fatiga (Tabla

2.5). Este tipo de fibra predomina en músculos relacionados con la postura y la función respiratoria.

En las **Fibras Tipo II** (también denominadas fibras rápidas o glucolíticas) el metabolismo glucolítico genera ácido láctico que produce mayor descenso del pH. Dependiendo del tipo de mecanismo energético predominante, pueden diferenciarse en tres subtipos:

Tipo II A: presenta tanto el metabolismo aeróbico como el lactacidémico, con predominio del aeróbico. A estas fibras se les denomina fibras rápidas oxidativas-glucolíticas.

Tipo II X: son fibras intermedias entre las de tipo II A y II B

Tipo II B: predomina el metabolismo anaeróbico.

Tabla 2.5

Principales características de los distintos tipos de fibras musculares

Características	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIX	Tipo IIB
Diámetro	Pequeño	Medio	Alto	Muy alto
Contenido de mioglobina	Muy alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Contenido mitocondrial	Muy alto	Alto	Medio	Muy bajo
Contenido citocromo	Muy alto	Alto	Medio	Muy bajo
Presencia capilares	Muy alta	Media	Muy baja	Baja
Sistema energético predominante	Aerobio	Aerobio/ Anaerobio	Anaerobio	Anaerobio
Resistencia a la fatiga	Muy alta	Alta	Media	Muy baja
Velocidad de contracción	Muy baja	Media	Alta	Muy alta
Potencia	Muy baja	Media	Alta	Muy alta

Reggiani y Mascarello, 2004; Listrat y col., 2016

Las fibras musculares son estructuras dinámicas que pueden cambiar de un tipo a otro siguiendo la siguiente secuencia: I ↔ IIA ↔ IIX ↔ IIB

2.4.2 FACTORES QUE AFECTAN A LAS FIBRAS MUSCULARES

Edad

El tamaño del músculo aumenta por procesos de hiperplasia e hipertrofia. La hiperplasia o aumento del número de fibras ocurre, principalmente, en la etapa fetal (Rehfeldt y col., 2004). La regulación del número de fibras musculares primarias es principalmente genética, sin embargo, el número de fibras secundarias y terciarias depende de factores epigenéticos, teniendo gran importancia la nutrición materna durante la gestación (Dwyer y col., 1994). El crecimiento del músculo esquelético en la etapa postnatal se debe principalmente a la hipertrofia o al aumento del tamaño de la fibra muscular (Rehfeldt y col., 2004).

El potencial para el crecimiento de tejido magro de un animal depende en gran medida del número de fibras formadas en la etapa prenatal, porque el crecimiento de tejido mediante el incremento del tamaño de las fibras en la etapa postnatal está limitado por la genética y razones fisiológicas (Rehfeldt y col., 2004). En general, lechones con bajo peso al nacimiento, exhiben menor número de fibras musculares, junto a una mayor deposición grasa y menor de proteína durante su crecimiento postnatal que animales de mayor peso al nacimiento (Dwyer y Stickland, 1991; Bee, 2007).

Tipo muscular

La distinta función de los músculos es la que determina en mayor medida la composición fibrilar, más que la raza o el manejo de los animales (Andrés y col., 2001). Los diferentes tipos de músculo presentan diferente actividad glucolítica, dependiendo del tipo de fibra predominante (Leseigneur-Meynier y Gandemer, 1991). El *Bíceps femoris* es considerado un músculo mixto en cuanto a su composición en fibras, presenta de promedio un 20% de fibras oxidativas, similar al 30 % del músculo *Tibialis cranialis* (Andrés y col., 2001), mientras que esta proporción aumenta en los músculos considerados oxidativos como el *Serratus ventralis* con un 33% de fibras tipo I (Bee y col., 1999) o el músculo *Romboides* con el 49-60% (Lefaucheur y col., 2004 Conde-Aguilera y col., 2016). Por otro lado, en *Longissimus dorsi* predominan las fibras

glucolíticas, con alrededor de un 90% del total de fibras musculares (Bee y col., 1999; Conde-Aguilera y col., 2016).

Según Wimmers y col. (2008), las fibras de MyHC IIb son las más abundantes en el lomo de cerdos de diferentes genotipos y parecen ser la fibra determinante que contribuye al crecimiento diferencial en este tejido. La isoforma IIb de MyHC constituye aproximadamente el 80% de las fibras musculares en el *Longissimus* (Lefaucheur y col., 2004; Wimmers y col., 2008).

Genotipo

Estudios sobre la abundancia de los diferentes tipos de fibras musculares muestran que las razas obesas presentan, en general, mayor proporción de fibras oxidativas que los cerdos del tipo convencional (Lefaucheur y col., 2004; Wimmers y col., 2008). Es probable que la selección intensiva para el crecimiento de músculo magro en cerdos convencionales indujera cambios en el metabolismo muscular, promocionando un mayor número de fibras glucolíticas y menor cantidad del tipo oxidativo. La raza Ibérica por ejemplo, tiene como media, un 20% de fibras tipo I frente al 10% que tienen las razas convencionales (Vázquez-Gómez y col., 2016). En músculos como *Longissimus lumborum* presenta un 12% de fibras oxidativas frente al 9% observado en la raza Landrace (Serra y col., 1998). En el músculo *Romboides* de la raza Meishan se observó un 17% más de fibras tipo I que en cerdos Large-White (Lefaucheur y col., 2004). Además, se ha observado que la cantidad de fibras musculares es fija a partir de aproximadamente los 90 días de gestación en cerdos (Wigmore y Stickland, 1983), y que el número es menor en cerdos Meishan (una raza de tendencia grasa) que en cerdos Large-White (Lefaucheur y col., 2004), lo que ayudaría a explicar la menor capacidad de crecimiento muscular postnatal de los cerdos grasos, en particular de los grandes músculos glucolíticos tales como *Longissimus dorsi* (White y col., 1995).

Estatus nutricional

Las proteínas musculares, como la actina y miosina junto al colágeno, representan las proteínas más abundantes del organismo y poseen una composición

en aminoácidos distinta, que puede verse afectada por el estatus nutricional (Reggiani y Mascarello, 2004). La malnutrición o la alimentación deficiente en proteína y energía dan lugar a un menor peso corporal, incluido el peso muscular. Generalmente también se reduce el diámetro de las fibras musculares, y en menor grado, el número de fibras (Rehfeldt y col., 2004). En general, una baja ingesta de alimento favorece la capacidad oxidativa del músculo y la proporción de fibras de contracción lenta en músculos de cerdos en crecimiento (White y col., 2000), mientras que dietas altas en proteína aumentan la capacidad glucolítica y disminuyen el metabolismo oxidativo (Karlsson y col., 1993).

Para algunos autores (Cervantes y col., 2013; Morales y col., 2015) la cantidad de miosina encontrada en el músculo resulta influenciada por alteraciones en los niveles de aminoácidos en la dieta, que se relacionan con el crecimiento muscular y cambios en el perfil aminoacídico encontrados en músculo y canal. No todos los aminoácidos de la dieta afectarían por igual, así Conde-Aguilera y col. (2010) observaron en lechones convencionales (Pietrain × Large-White × Landrace) alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados, cómo la cantidad de miosina en *Longissimus dorsi* y canal no sufría modificaciones. En cambio, en los estudios de Morales y col. (2015) la mayor cantidad de lisina en la dieta provocó una mayor expresión de miosina mediante estimulación de la síntesis de proteínas corporales a nivel transcripcional.

Por otro lado, se ha observado que la restricción de lisina dietética da lugar a una mayor proporción de fibras oxidativas y mayor actividad de citrato sintasa (indicador de la actividad oxidativa de la célula) en músculos esqueléticos de cerdos en crecimiento (Katsumata y col., 2008). Las razones de este cambio pueden radicar en el aumento encontrado en este mismo estudio de la abundancia de mRNA de la proteína 1- α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), que promueve la transformación de la fibra muscular desde el tipo II glucolítica al tipo I oxidativa a través de la biogénesis de mitocondrias (Puigserver y col., 1998, Wu y col., 1999). Dado que el músculo con una mayor capacidad oxidativa puede tener un mayor contenido en grasa intramuscular, Katsumata y col. (2008) también analizaron la expresión del receptor γ 2 activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ 2), que es un regulador fundamental de la adipogénesis (Tontonoz y col., 1994), y encontraron mayores niveles de este receptor con la deficiencia en lisina, junto con un aumento en la cantidad de GIM en los músculos

Longissimus dorsi y *Romboides*. Esto sugiere que el aumento de GIM puede estar relacionado con la mayor cantidad de mitocondrias y el incremento en la regulación de la PPAR γ 2. La transición de fibras tipo II a fibras tipo I, podría ser una forma de utilizar los lípidos que se originan del exceso de cadenas carbonadas y energía resultantes en las dietas deficientes en aminoácidos esenciales. Esto podría también mejorar la eficiencia energética de los músculos puesto que, las fibras de tipo I son más resistentes a la fatiga, tienen un menor gasto de energía por unidad de tensión, y están mejor equipadas para oxidar los ácidos grasos que las fibras de tipo II.

Algo similar ocurre en cerdos cruzados Piétrain \times (Large-White \times Landrace) de unos 13 kg de peso vivo, sometidos a una restricción de metionina en la dieta del 50% de sus necesidades (Conde-Aguilera y col., 2016). En los músculos como *Longissimus dorsi*, *Semitendinosus* y *Romboides* del grupo alimentado con la dieta deficiente en metionina, se observó una mejora de la capacidad antioxidante junto a una reducción del metabolismo glucolítico, debido al incremento de las concentraciones de glutatión y citrato sintasa, aunque sólo en el músculo *Romboides* hubo un aumento significativo en la proporción de fibras oxidativas (Conde-Aguilera y col., 2016). En el caso de los músculos *Longissimus dorsi* y *Romboides*, la mayor actividad de enzimas relacionadas con la glucólisis sugiere una mayor capacidad para oxidar los carbohidratos.

2.4.3 EL MÚSCULO Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE LA CARNE

La calidad de la carne puede ser definida en función de 4 términos diferentes: calidad higiénica, calidad nutricional, calidad organoléptica y calidad tecnológica. La calidad higiénica está relacionada con la carga microbiana del producto y la presencia de residuos químicos. La calidad organoléptica o sensorial depende en gran medida de la percepción del consumidor. Incluye color, olor, firmeza, ternura y jugosidad, así como el *flavor*, que está asociado con los aromas liberados en la boca cuando se consume el producto. Estos parámetros también están relacionados con cualidades tecnológicas como el pH y la capacidad de retención de agua durante el almacenamiento en frío o durante el cocinado, y a posibles daños producidos en la carne al ser cortada. Por último, las cualidades nutricionales dependen principalmente del valor nutricional de las grasas y las proteínas que componen la carne, aumentando

su valor con la cantidad de proteína, aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados. La Organización Mundial de la salud (OMS, 2015) recomienda que la ingesta total de grasa total para consumo humano sea alrededor del 25-30% de la ingesta total energética, conteniendo menos del 10% en ácidos grasos saturados, 1% de ácidos grasos trans, 5-8% de poliinsaturados n-6, 1-2% de AGPI n-3 y el resto ácidos grasos monoinsaturados. Se fomenta, por tanto, reducir el consumo de AGS (que se sabe aumentan el colesterol total y el colesterol LDL) y aumentar la ingesta de AGPI n-3. Entre los AGPI n-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosaheptaenoico (DHA, 22:6n-3) han demostrado tener un papel importante en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, además, son fundamentales para el cerebro y el desarrollo visual en el feto, el mantenimiento de tejidos neurales y visuales a lo largo de la vida, y pueden reducir el riesgo de cáncer y diabetes.

Los tres componentes principales del músculo (es decir, fibras musculares, tejido conectivo y grasa) están implicados en los distintos parámetros de calidad de la carne, pero en grados variables dependiendo de la especie, tipo de músculo y técnicas de procesamiento del producto (Lefaucheur, 2010). Las fibras tienen una gran plasticidad, que les permite que unos tipos de fibras puedan reconvertirse en otras durante el crecimiento, por factores externos como el ejercicio, el ambiente y la alimentación (Vázquez-Gómez y col., 2016), que influyen en las características de la canal y la calidad de la carne.

Los procesos bioquímicos *peri* y *postmortem* que sufre el músculo dependen en gran medida del tipo de fibra muscular, concretamente del grosor y el tipo metabólico (Listrat y col., 2016). Durante el almacenamiento en frío de las canales, es importante la capacidad de los tejidos de retener agua que está relacionada con el descenso de pH *postmortem*. Un mayor descenso de pH (o un bajo pH final) junto a un aumento de la temperatura causa desnaturalización de las proteínas musculares, lo que ocasiona una reducción de la capacidad de retención de agua y un incremento de la exudación y las pérdidas durante el cocinado. Todo esto puede dar como resultado una carne pálida, suave y exudativa (PSE). En general, se considera que las fibras glucolíticas presentan una mayor caída de pH que las oxidativas por su mayor contenido en glucógeno y ácido láctico, aunque no siempre se observa esta relación (Lebret y Guillard, 2005). También el diámetro de las fibras influye de manera positiva en la ternura (Gondret y col., 2006; Hamill y col., 2012).

En un intento de conseguir mayores rendimientos productivos en animales criados en sistemas intensivos a la vez que se obtienen carnes más magras, se ha reducido considerablemente la cantidad de grasa depositada en el animal como podemos observar en cerdos modernos. Esto ha reducido en algunos casos el nivel de veteado de la carne por debajo de 1% del peso del animal (Wood y col., 2008), comprometiendo seriamente la calidad de la carne. El contenido de grasa intramuscular es generalmente aceptado como un factor importante entre los rasgos sensoriales y la palatabilidad de la carne puesto que se correlaciona de manera positiva con la ternura y la jugosidad, facilitando la masticación (Wood y col., 2004; Teye y col., 2006; Hocquette y col., 2010). Se ha observado que una disminución de $GIM < 2,5\%$ conlleva la reducción de los rasgos sensoriales de la carne de cerdo (Fernandez y col., 1999). Tiene, por tanto, un peso importante en la aceptabilidad final del producto por parte del consumidor (Brewer y col., 2002; Font-i-Furnols y col., 2012). Por ejemplo, en España, los productos curados con mayor contenido en grasa intramuscular (en torno al 4,7%) parecen ser mejor valorados que aquellos con menor contenido (Cilla y col., 2006). Aunque hay fuertes correlaciones entre esta grasa y los rasgos de calidad, ciertos trabajos muestran una relación débil (van Laack y col., 2001; Channon y col., 2004; Moeller y col., 2010).

La composición en ácidos grasos de los músculos afecta a su estabilidad oxidativa durante el procesado y almacenamiento, siendo la oxidación de lípidos la principal causa del deterioro sensorial y nutricional de la carne. Un procedimiento habitual para medir la estabilidad oxidativa de los ácidos grasos en alimentos es la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que mide el producto de la oxidación lipídica, el malondialdehído (MDA). Valores superiores a 0,5 mg MDA/kg músculo son críticos ya que indican niveles de productos de la oxidación lipídica que producen olor y sabor rancio, detectable por parte de los consumidores.

La grasa con un perfil en ácidos grasos alto en monoinsaturados (especialmente el oleico, C18:1) y bajo en ácido linoleico (C18:2) se ha asociado con un mejor sabor de la carne, concretamente en productos curados de cerdo Ibérico (Serra y col., 1998). Por otro lado, niveles abundantes de AGPI en la carne pueden tener consecuencias tecnológicas y sensoriales indeseables, ya que los AGPI son más susceptibles a la oxidación lipídica, dando lugar a alteraciones de la textura, sabor y color de la carne, produciendo grasa más suave y proclive al enranciamiento (Cava y col., 1999; Ramirez y Cava, 2007). Por ejemplo, durante la curación del jamón, la oxidación lipídica da

lugar a compuestos volátiles que influyen en el *flavor*. Así, la oxidación de ácidos grasos como el oleico produce aldehídos como el nonanal y el octanal, asociados con un aroma agradable, mientras que la oxidación de los ácidos grasos insaturados da como resultado a la aparición de pentanal, hexanal y heptanal, relacionados con un *flavor* desagradable (Cava y col., 2000).

Aunque pueda parecer deseable mayor contenido en AGPI desde el punto de vista nutricional (Simopoulos, 2011), esto reduciría la estabilidad oxidativa de la carne y sus derivados. De tal manera, que tanto para la mejora del proceso técnico como para la calidad de los productos, se busca menor cantidad de AGPI (particularmente C18:2) y más de AGS y AGMI (C16:0, C18:0 y C18:1; Daza y col., 2007).

La relación entre fibras musculares con la cantidad de GIM y la calidad de la carne es un tema complejo. En primer lugar, depende del tipo de músculo en estudio y de factores como la especie, el genotipo, la edad, el tipo de nutrición, así como de las condiciones de sacrificio y de procesamiento de la carne (Vázquez-Gómez y col., 2016). Una pequeña proporción de triacilglicéridos se encuentran en forma de gotitas dentro de las fibras musculares, mientras que la mayoría se encuentran dentro de los adipocitos situados en el perimio o en el espacio que queda entre las miofibras (Essén-Gustavsson y col., 1994; Gondret y col., 1998). A menudo se afirma que los músculos oxidativos contienen más GIM que los músculos glucolíticos (Bee y col., 1999; Tejerina y col., 2012). Sin embargo, un análisis cuidadoso de los datos disponibles no confirma esta afirmación, y muestra que la cantidad y el tamaño de los adipocitos intramusculares no estarían relacionados con el tipo de fibra muscular (Andrés y col., 2001; Muriel y col., 2002; Lefaucheur, 2010; Listrat y col., 2016), debido, como hemos mencionado antes, a que los adipocitos pueden estar distribuidos tanto dentro de las fibras como en el espacio entre fibras, lo que puede contribuir a que no haya una relación directa entre grasa y fibra muscular. En conjunto, existe alguna relación entre el tipo de fibra y la calidad de la carne, pero no es universal entre las especies.

La relación positiva entre la proporción de fibras de tipo I y el sabor es probablemente debida a su alto nivel de fosfolípidos (Leseigneur-Meynier y Gandemer, 1991; Alasnier y col., 1996). Sin embargo, los altos niveles de AGPI en fosfolípidos también aumentan el riesgo de oxidación de los ácidos grasos y del desarrollo de rancidez. Además, una alta proporción de fibras de tipo I es propensa a

la producción de carne oscura, firme y seca (DFD), en particular en la carne de vacuno (Ozawa y col., 2000). Asimismo, la proporción de lípidos y la tasa de renovación proteica de las fibras (Baillie y Garlick, 1991), afectan a la jugosidad y a la ternera, respectivamente.

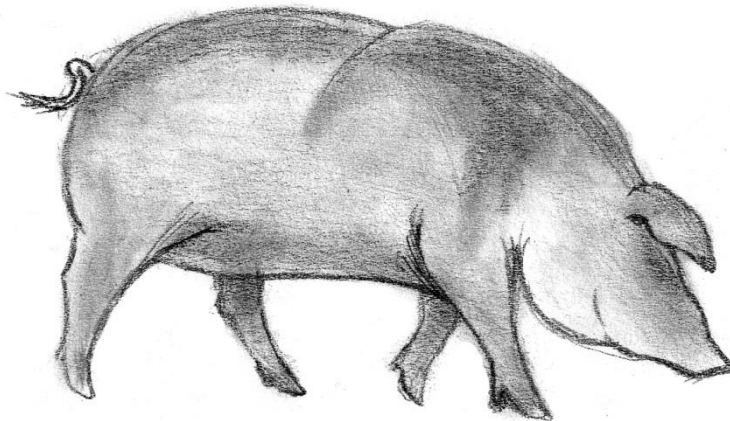
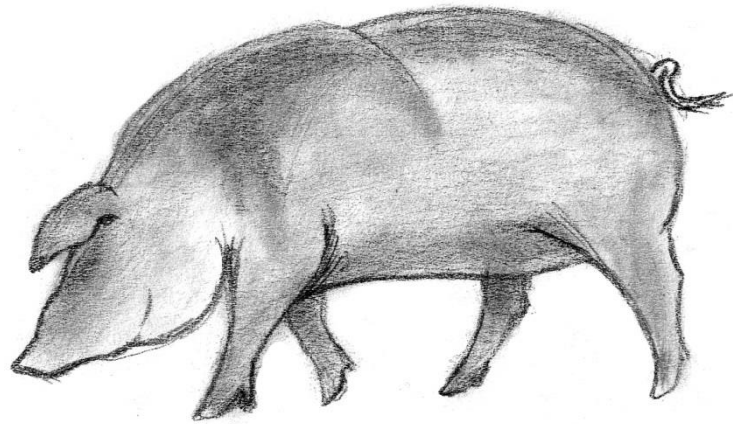
Respecto a la susceptibilidad a la oxidación y a la capacidad antioxidante de los músculos, las fibras oxidativas son más susceptibles a ser oxidadas (Andrés y col., 2001), debido a su alto contenido en AGPI (y por tanto, principales productores de compuestos reactivos al oxígeno). Además, poseen mayor potencial antioxidante, caracterizado por presentar mayor contenido en compuestos antioxidantes como polifenoles y tocoferoles y mayor actividad de todas las enzimas antioxidantes que las fibras de tipo II (Tejerina y col., 2012; Steinbacher y Eckl, 2015).

Otro factor que tiene cierta influencia en las cualidades organolépticas es el perfil de aminoácidos. Debido a su gran masa (que representa el 40-45% del peso corporal), el músculo esquelético es el mayor reservorio de aminoácidos en el cuerpo, tanto libres como unidos a proteína. El sabor proviene de sustancias aromáticas tales como aminoácidos y péptidos pequeños, y el aroma deriva principalmente de sustancias volátiles liberadas durante la cocción de carne. Cada aminoácido contribuye, en diferentes grados, al sabor de la carne (Liu y col., 2015). Los compuestos activos en la carne no sólo mejoran el sabor por ellos mismos, sino que también es debido a la reacción con otros, generando algunos componentes del aroma a través de varias vías, como la reacción de Maillard (Newton y col., 2012). La reacción de Maillard entre los aminoácidos azufrados y el azúcar puede producir un aroma carnosos (Yu y col., 2012).

Por último, cabe mencionar la relación entre los diferentes patrones metabólicos del músculo y las características de color de la carne, ya que es uno de los parámetros del aspecto (junto al vetado) que determina la aceptabilidad por parte del consumidor (Font-i-Furnols y col., 2012). Las carnes más rojas están asociadas con mayor contenido en fibras oxidativas y pigmentos hemo. La contribución al color en las carnes se debe casi exclusivamente a dos únicos pigmentos, mioglobina y hemoglobina, y el estado en el que se encuentre la mioglobina (oximioglobina, deoximioglobina y metamioglobina) determinará el color de las piezas. Por otro lado, la luminosidad está relacionada con mayor cantidad de AGPI que hace a la grasa más fluida y permite mayor reflejo de luz en la superficie de la carne. Valores más blancos

y amarillos se asocian con mayor oxidación lipídica (Maw y col., 2003), mientras que carnes más rojas y oscuras son mejor aceptadas por el consumidor.

ASPECTOS METODOLÓGICOS



3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta tesis agrupó dos ensayos experimentales. En ambos, la metodología corresponde a la de un ensayo comparado de crecimiento y alimentación en el que se emplearon dos genotipos. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales usados para esta tesis se realizaron de acuerdo con la legislación española de bienestar animal (RD53/2013) y tras obtener la correspondiente autorización del Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la autoridad local competente (Junta de Andalucía).

3.1.1 ENSAYO I (artículos 1, 2 y 4)

Para este experimento se utilizaron un total de 28 machos castrados, la mitad de ellos de pura raza Ibérica, procedentes de la empresa Sánchez Romero Carvajal Jabugo, S. A, (finca Montecastilla, Huelva) y la otra mitad Landrace × Large-White (procedentes de la Granja “La Alcubilla”, Moclín, Granada, España), de $10,3 \pm 0,3$ y $10,4 \pm 0,3$ kg de PV inicial y 58 y 50 días de edad, respectivamente. Las dietas experimentales fueron isonitrogenadas e isoenergéticas conteniendo 200 ± 1 g PB/kg MS y 14,7 MJ de energía metabolizable /kg MS (Tabla 3.1). Las dietas fueron formuladas con cebada, maíz, gluten de maíz y soja, e idénticas en composición, excepto por su contenido en lisina. Una de ellas, adecuada en lisina, contenía 10,9 g lisina/kg dieta y la otra, deficiente en lisina, 5,2 g lisina/kg dieta. La cantidad de HCl-L-Lys añadida a la dieta adecuada se sustituyó en la dieta deficiente en lisina por cantidades equivalentes de L-glutámico y L-glicina. Después de un periodo corto de adaptación a la dieta, comenzó el experimento (Fig. 3.1 y 3.2). La mitad de los animales de cada genotipo ($n=7$) recibió una de las dos dietas experimentales (Fig. 3.3). Los animales fueron alojados individualmente en parques de 2m^2 , en condiciones de termoneutralidad.

Tabla 3.1
Ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales

Dietas Experimentales		
Ingredientes, g/kg	Adecuada en lisina	Deficiente en lisina
Maíz	420	420
Cebada en grano, 2 carreras	340	340
Gluten de maíz	112	112
Concentrado de soja (65% PB)	35	35
Fosfato cálcico dibásico	17	17
Carbonato cálcico	6,6	6,6
NaCl	5	5
Premezcla vitaminas/minerales ¹	3	3
L-Lys·HCl, 78,8%	8,16	-
L-Thr, 98%	2,65	2,65
DL-Met, 99%	0,4	0,4
L-Trp, 98%	1,15	1,15
L-Val, 96,5%	1,8	1,8
L-Glu, 99%	-	4,08
Gly, 99%	-	4,08
Almidón de maiz	47,1	47,1
Composición nutricional analizada, g/kg MS		
Proteína bruta, PB	201	199
Lys	10,9	5,2
Lys/PB, g/kg	54,2	26,1
Met	3,77	3,7
Thr	9,61	9,58
Trp ²	2,4	2,4
Ile	6,73	6,58
Leu	22,4	22,5
His	5,17	5
Phe y Tyr	10,2	10
Val	10,3	10,3
Lípidos	25,5	25,8
Cenizas	49,5	51
Energía bruta, MJ/kg	18,7	18,5
Energía metabolizable, MJ/kg	14,8	14,6

¹Contiente por kg de dieta: retinol, 3,38 mg retinil acetato; colecalciferol, 56,3µg; DL-α-tocoferol, 25,2 mg DL-α-tocoferol acetato; menadiona, 1,5 mg menadiona bisulfato sódico; tiamina, 0,15 mg; riboflavina, 3 mg; piridoxina, 0,15 mg; cianocobalamina, 15 µg; ácido fólico, 15 µg; ácido nicotínico, 22,5 mg; ácido D-pantoténico, 15 mg pantoténico cálcico; Mn, 15 mg MnSO₄·4H₂O; Fe, 75 mg FeSO₄·7H₂O; Zn, 120 mg ZnO; I, 450 µg as KI; Cu, 60 mg CuSO₄·5H₂O; Co, 300 µg CoSO₄·7H₂O. ²Calculado (FEDNA, 2010)

El nivel de alimentación empleado correspondió al 85% de la ingesta *ad libitum* de la raza Ibérica, con mayor capacidad de ingesta voluntaria, ajustando ésta semanalmente al peso vivo (PV), según la relación matemática descrita en Conde-Aguilera y col. (2011):

$$\text{Ingesta voluntaria (g /d)} = -153 \pm 24 + 72,5 \pm 1,5 \times \text{PV (kg)}$$

Los restos de alimento fueron retirados diariamente, pesados y desecados para calcular la ingesta individual efectiva. El agua fue ofrecida *ad libitum* durante todo el experimento. Cuando los animales alcanzaron aproximadamente 25 kg de PV se sacrificaron mediante desangrado, previa electronarcosis.

Inmediatamente después del sacrificio se procedió al muestreo (Fig. 3.4). En primer lugar se recogieron las muestras de sangre en tubos con EDTA, que se centrifugaron a 1400 g a 4°C durante 20 min para obtener el plasma, que se conservó a -80°C. A continuación, se extrajeron los órganos (tracto gastrointestinal, aparato genitourinario, bazo, hígado, riñones, corazón) y la grasa mesentérica y se pesaron por separado. El tracto gastrointestinal, junto a la vejiga se vaciaron previamente. La cabeza se separó de la canal cortando por la articulación atlanto-occipital, y las patas y manos, a nivel de la articulación carpo-metacarpiana y tarso-metatarsiana, respectivamente. Seguidamente, la canal se pesó y se dividió longitudinalmente en dos mitades (semicanal izquierda/derecha) por el punto medio del raquis.

Sobre la media canal izquierda se realizó el despiece como se describe en Nieto y col. (2015) para obtener los componentes de la canal. Primero, se tomaron las medidas de espesor del tocino dorsal en tres zonas diferentes: a nivel de la primera costilla (A, mm) y de la última (B, mm) y a la altura de la última vértebra lumbar (C, mm). La longitud de la canal (L, cm) se midió desde la parte proximal de la primera costilla hasta la sínfisis púbica. A continuación, se separaron y pesaron la grasa interna, el solomillo, las costillas y el espinazo. Posteriormente se practicaron dos cortes sobre la canal, el primero a nivel de la 5ª costilla y el segundo a la altura de la rótula del jamón, que dividieron la canal en tres partes. En la parte delantera, se separaron la cabezada de magro y la paleta sin perfilar con el tocino delantero incluido, mientras que el jamón, también sin perfilar, constituyó la parte posterior. De la parte central se obtuvo el lomo limpio de grasa, la panceta y el tocino dorsal. Todas estas piezas también fueron pesadas y anotadas. Los músculos *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* de la semicanal izquierda se pesaron y guardaron a -20°C hasta que fueron cortados y picados en una picadora (Moulinex, Barcelona,

España). Seguidamente se liofilizaron y molieron para su posterior análisis. Además se guardaron alícuotas de las muestras de *Longissimus dorsi*, *Biceps femoris* y del tejido adiposo dorsal a -80°C.

Sobre la mitad derecha de la canal se hizo el análisis de composición química de la canal. Para lo cual la canal se cortó en trozos pequeños, que se picaron en una picadora de cuchillas (Talleres Cato, Sabadell, España). Una vez homogenizadas las muestras, se tomaron alícuotas para su liofilización y posterior molienda.

El motivo por el que se eligieron animales jóvenes para la realización de este ensayo fue para reducir, en la medida de lo posible, las diferencias entre los dos genotipos utilizados, en cuanto a las características fisiológicas, potencial de crecimiento y necesidades nutricionales. , En este sentido, como hemos descrito previamente en el apartado 2.1.2, las necesidades en cuanto a proteína bruta y lisina en la dieta, en esta etapa del desarrollo, son más parecidas entre los cerdos Ibéricos y los de tipo convencional. De esta manera, el utilizar animales jóvenes con edad y peso similar y con necesidades en nutricionales semejantes, nos ha permitido llevar a cabo una comparación entre ambas razas sin que otros factores influyan sobre las posibles diferencias observadas, o al menos, que su efecto se vea atenuado.



Figura 3.1 Comederos con las dietas deficientes (izquierda) y adecuadas en lisina (derecha)

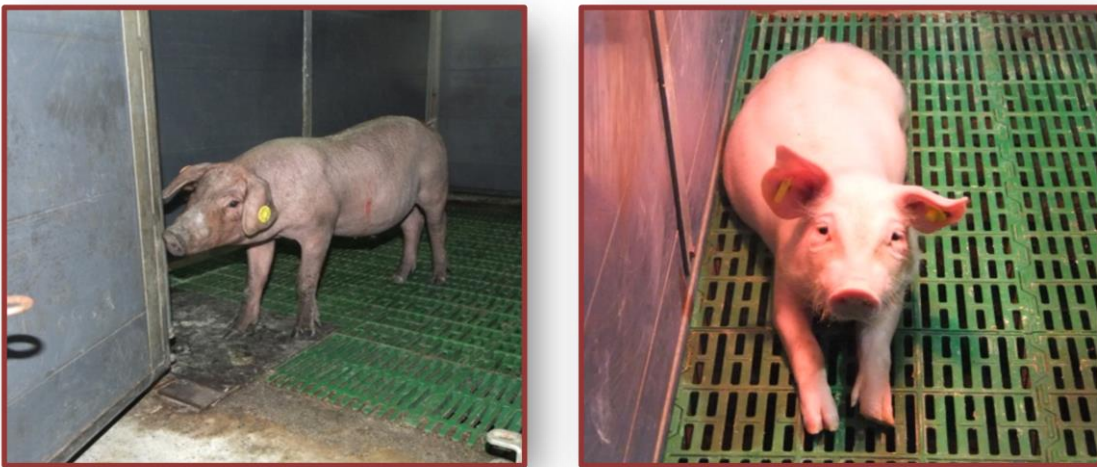


Figura 3.2 Animales durante el experimento.

3.1.2 ENSAYO II (artículo 3)

El experimento se llevó a cabo con 32 machos castrados, 16 de ellos eran cerdos Ibéricos puros, de la línea Silvela, procedentes de la empresa Sánchez Romero Carvajal Jabugo, S. A. (finca Montecastilla, Huelva) y 16 de una raza porcina magra (Landrace × Large-White, LDW) procedentes de la empresa Jodral Gutierrez S. A. (Córdoba, España). El peso al inicio del experimento fue de aproximadamente 15 kg. Los animales permanecieron alojados individualmente en parques de 2m² en sala termorregulada (zona de termoneutralidad), y fueron asignados al azar a uno de los dos tratamientos experimentales, con 8 animales por genotipo y tratamiento nutricional (Fig. 3.5). Se formularon dos dietas isoenergéticas (14,0-14,5 MJ EM/kg MS) que diferían en el contenido proteico (Tabla 3.2): una dieta baja en proteína o dieta LP (*low protein*), que contenía el nivel de proteína adecuado para el genotipo Ibérico (130 g PB/kg MS; Nieto y col., 2002, Barea y col., 2007) y una dieta alta en proteína o dieta HP (*high protein*), con una concentración proteica adecuada para el genotipo magro (170 g PB/kg MS; BSAS, 2003). El resto de nutrientes se formularon para cubrir o exceder las necesidades de los cerdos convencionales en crecimiento (BSAS, 2003). Estas dietas se mantuvieron durante todo el periodo experimental por simplicidad en el desarrollo del ensayo. El nivel de alimentación se restringió al 80% del estimado como *ad libitum* en el cerdo Ibérico, cuya ingesta voluntaria es mayor que la de cerdos convencionales (Nieto y col., 2001; Morales y col., 2002). La ración se ajustó semanalmente en función del peso vivo del animal (Nieto y col., 2012). La ingesta se registró diariamente para cada animal, cuantificando los restos de alimento ofrecido y no ingerido.

Cuando los animales alcanzaron los 50 kg PV se sacrificaron 4 cerdos por genotipo y tratamiento dietético. El resto, es decir, otros 4 animales por genotipo y tratamiento, se sacrificaron cuando alcanzaron aproximadamente los 115 Kg PV, por desangrado previa electronarcosis, después de 12 horas de ayuno. Después del sacrificio se tomaron rápidamente muestras de los músculos *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* de la mitad izquierda de la canal, que se mantuvieron congelados a -20°C hasta que fueron triturados, liofilizados y molidos para su análisis (Fig. 3.6).

A las 24h del sacrificio, se tomaron muestras de *Longissimus* (a nivel de la última costilla, primer vértebra lumbar) y del *Biceps femoris* (en su parte central) en la semicanal derecha, para las medidas del color.

Tabla 3.2

Ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas

Dietas Experimentales		
Ingredientes, %	Dieta LP	Dieta HP
Cebada	96,1	85,0
Harina de soja 44	-	11,10
L-Lys HCl	0,53	0,52
L-Thr	0,13	0,13
DL-Met	0,04	0,06
NaCl	0,50	0,50
Carbonato cálcico	0,30	0,25
Fosfato cálcico dibásico	2,20	2,20
Premezcla vitaminas/minerales ¹	0,30	0,30
Composición nutricional analizada, %		
Materia seca	89,6	89,5
Cenizas	3,91	4,27
Proteína bruta	12,6	16,6
Lípidos	4,96	5,08
Fibra ácido detergente	6,05	6,13
Energía metabolizable, kJ/g ²	11,9	12,0
Lys	0,80	1,05
Met + Cys	0,42	0,52
Thr	0,48	0,63
Ile	0,41	0,59
Leu	0,76	1,04
His	0,24	0,33
Phe y Tyr	0,93	1,24
Val	0,56	0,74

¹ Contiene por kg de dieta: vitamina A, 5000 IU; vitamina D3, 1000 IU; vitamina E, 15 mg; vitamina K3, 2 mg; tiamina, 1,3 mg; riboflavina, 3,5 mg; niacina, 15mg; pantoténico cálcico, 10 mg; piridoxina, 1,5 mg; biotina, 0,1 mg; ácido fólico, 0,65mg; vitamina B12, 25 µg; Mn, 30 mg; Fe, 80 mg; I, 750 µg; Cu, 6 mg; Co, 750 µg; Zn, 60mg; Se, 0,1 mg; etoiquina, 150mg.

² Calculado de acuerdo a Sauvart y col. (2004)

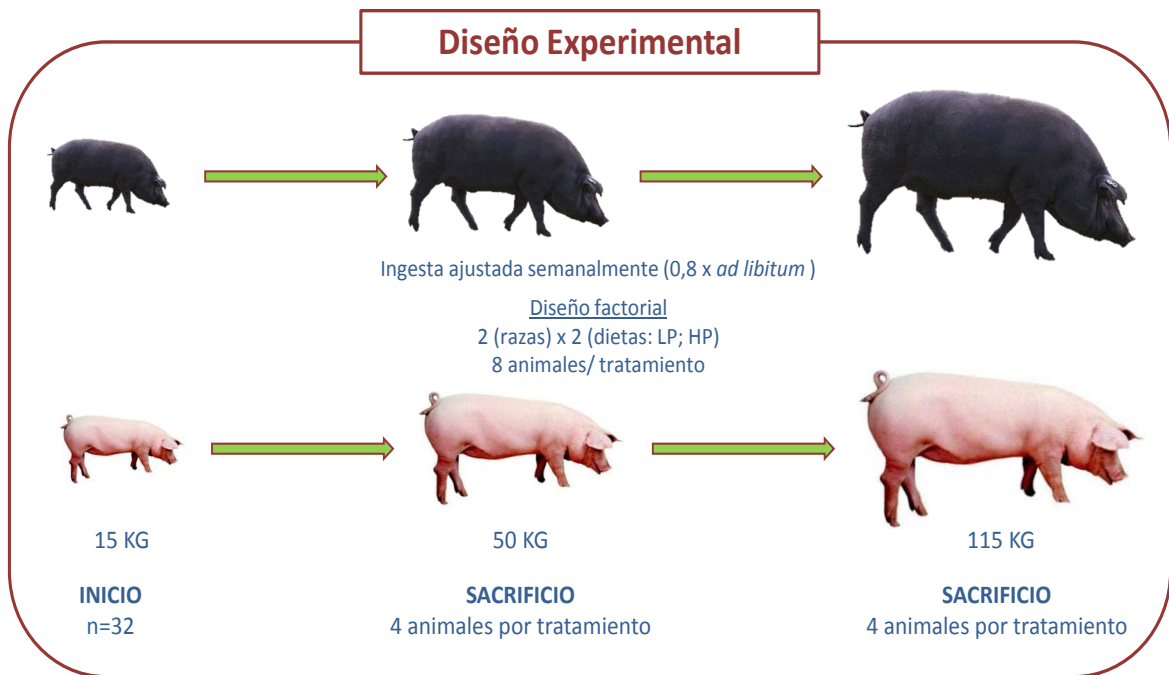


Figura 3.5 Diseño Experimental del Ensayo II.

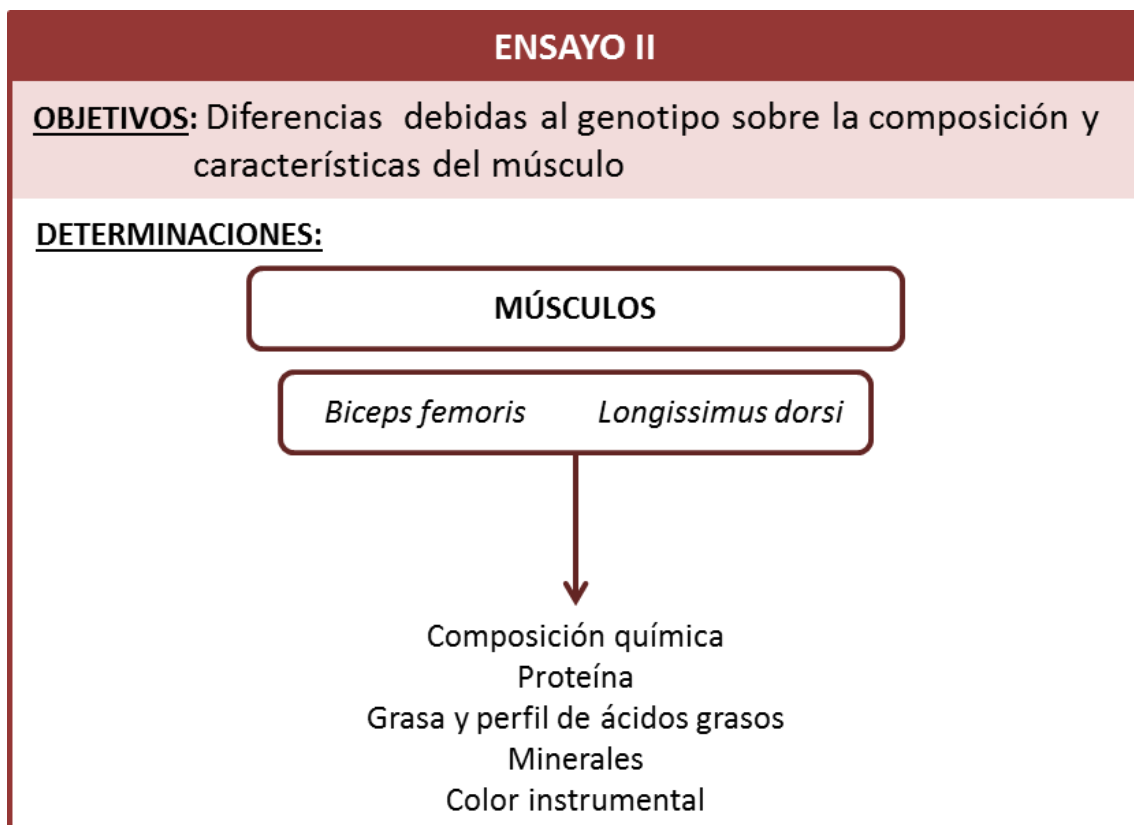


Figura 3.6 Resumen de los análisis realizados en las muestras del Ensayo II.

3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE DIETAS Y TEJIDOS

Las determinaciones de proteína bruta, grasa, energía bruta, cenizas totales y materia seca en las dietas experimentales y en los componentes corporales (canal y músculos) se llevaron a cabo según la metodología descrita en Nieto y col. (2002).

A continuación se describen brevemente:

- Materia seca: Se determinó a partir de la pérdida de peso que sufre la muestra en estufa de desecación a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ (AOAC, 2000) durante un periodo de 20-24 horas.

- Cenizas totales: Los minerales o cenizas totales, constituyen el residuo obtenido tras la incineración de la muestra a $550 \pm 25^\circ\text{C}$ en un horno mufla, elevando la temperatura de forma progresiva.

- Proteína bruta: Se calculó por determinación de nitrógeno total en una alícuota de la muestra (0,1 g) mediante combustión, según el método Dumas, en un equipo TruSpect CN (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU). Utilizamos el valor de conversión de 6,25, el cual asume un contenido medio de 0,16 g de N/g de proteína.

- Grasa: En las muestras de tejidos, la determinación se realizó en alícuotas homogeneizadas mediante extracción con cloroformo:metanol 2:1 en Soxhlet (Uniplac 6002316, Selecta SA). Para las dietas experimentales, se utilizó éter de petróleo para la extracción.

- Energía bruta (EB): La determinación se llevó a cabo en una bomba calorimétrica isoperibólica (Modelo 1356 Parr Instrument Company, Moline, IL, EEUU), ubicada en un laboratorio termorregulado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. La EB de la muestra o su calor de combustión es:

$$EB \text{ (cal/g)} = \frac{k(T_f - T_i) - a}{p}$$

Donde k es la capacidad de calor efectiva del sistema, una constante que indica el número de calorías necesarias en el equipo para aumentar 1°C la temperatura del agua del vaso calorimétrico (se determina por combustión de un comprimido de ácido benzoico puro, de capacidad calorífica conocida); T_f y T_i son las temperaturas registradas al final y al inicio de la determinación, respectivamente; a es la suma de los contenidos energéticos del hilo metálico y de la bolsa de polietileno utilizados en el procedimiento, y p es el peso de la muestra en gramos.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa que es más rápida para la determinación cuantitativa de aminoácidos que la cromatografía clásica de intercambio iónico (Fekkes y col., 2000; Schwarz y col., 2005). Para todas las determinaciones se siguió el método Pico-Tag (Cohen y col., 1989), tanto para el análisis de aminoácidos libres en plasma como para los aminoácidos procedentes de la hidrólisis de la proteína corporal y de las dietas empleadas.

Aminoácidos hidrolizados

La concentración de aminoácidos de las muestras de dietas, músculos y canal se determinaron previa hidrólisis en HCl 6N, obtenido por ebullición constante, adicionando 1% de fenol. La hidrólisis se realizó en tubos de vidrio Pirex alojados en un termobloque a 110°C durante 24 horas. Este tratamiento rompe las uniones peptídicas y libera los aminoácidos individuales. Además, la glutamina y la asparragina se hidrolizan a glutamato y aspartato, respectivamente, y se destruye casi completamente el triptófano, por lo que no es determinado mediante este método. Tras la hidrólisis, se filtran las muestras con filtro de jeringa desechable de 0,45 µm y se guardan a -20°C hasta su análisis.

Una vez obtenidos los hidrolizados de todas las muestras a analizar, se sometieron a una fase de desecado, resecado y derivación. Para ello se tomaron

25 μl del filtrado de cada muestra, previa dilución (1:3) con agua Milli-Q, y se añadió 25 μl de estándar interno en microviales cilíndricos de 6 mm de diámetro, y se secaron al vacío en una centrífuga termorregulada (SpeedVac, SPD131DDA-230, Thermo, Milford, MA, EE.UU). Como estándar interno se utilizó una mezcla de Norleucina 0,4 mM (DL-Norleucine, N1398 Sigma-Aldrich) y α -Aminoadípico 0,4 mM (DL-2-Aminoadipic acid, A0637 Sigma-Aldrich). Paralelamente, se prepararon 4 viales con cantidades crecientes del estándar externo (25-50-75-100 μl) previamente preparado con una mezcla de 17 aminoácidos (Amino Acid Standard H (10 x 1ml) Pierce NCL 0180, Thermo Fischer Scientific). En el caso de determinación de aminoácidos azufrados se añadió a la solución ácido cisteico 0,2 mM y metionina sulfona 0,2 mM. Los viales con el patrón externo siguieron un proceso paralelo al de las muestras.

Seguidamente se añadió la solución de resecado: (metanol/agua Milli-Q®/triethylamina, en proporción 2:2:1) a los viales y se volvieron a secar al vacío. De esta manera se neutraliza cualquier residuo ácido que pudiera quedar adherido al tubo. A continuación, se añadió el reactivo de derivación (metanol/agua Milli-Q®/triethylamina/fenilisotiocianato, 7:1:1:1). En esta etapa el grupo amino primario reacciona con el fenilisotiocianato (PITC, Edman's Reagent, Ref 26922, Thermo Fischer Scientific) para formar un fenil-tiocarbamil-aminoácido (Fig. 3.7) que puede detectarse con alta sensibilidad a 254 nm, después de haber hecho la separación de los derivados por cromatografía en fase reversa.

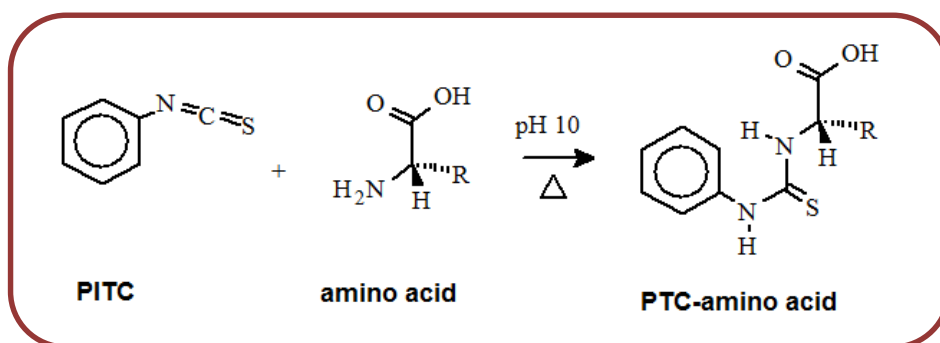


Figura 3.7 Reacción del fenilisotiocianato (PITC) con aminoácidos

Para la determinación de los aminoácidos en el cromatógrafo, se utilizó una columna Nova-Pack C18-4 μm Waters Pico-Tag (150 mm x 3,9 mm; Ref. WAT 037520, Waters Cromatografía, SA, España) a una temperatura constante de 36°C y un gradiente multietapas de dos eluyentes (Tabla 3.3). El eluyente A fue una mezcla

0,14 M de acetato de sodio trihidrato (pH 6,3) y acetonitrilo (94:6, v/v); y el eluyente B fue agua Milli-Q® y acetonitrilo (40:60, v/v).

Tabla 3.3

Gradiente utilizado en la determinación de aminoácidos hidrolizados.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	1	100	0
15	1	54	46
15,2	1	0	100
16,7	1	0	100
17	1,5	0	100
18,2	1,5	0	100
18,5	1,5	100	0
27	1	100	0
28	1	100	0

El contenido de cisteína y metionina se determinó en muestras en paralelo como ácido cisteico y metionina sulfona, respectivamente, después de su oxidación con ácido per fórmico antes de la hidrólisis de proteínas (Moore, 1963).

Aminoácidos libres en plasma

Las muestras de plasma (500 µl) conservadas a -80°C fueron descongeladas y desproteinizadas adicionando 500 µl de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, que contenía DL-norleucina 2 mM como patrón interno. Posteriormente, se sometieron a centrifugación durante 60 minutos a 2700 g y 5°C (Eppendorf 5810R AG, 22331, Hamburg, Alemania) con el propósito de separar los aminoácidos libres de la proteína precipitada, protegiendo de esta manera la columna de compuestos de alto peso molecular. Este sobrenadante ácido se mantuvo a -20°C hasta su análisis.

Al igual que para los aminoácidos hidrolizados, las muestras de plasma desproteinizadas se sometieron a una fase de desecado, resecado y derivación, con ligeras diferencias. En un vial añadimos 50 µl de la muestra y en otros tres viales añadimos concentraciones crecientes del patrón externo (12,5-25-50 µl). El patrón externo consistió en una mezcla de aminoácidos ácidos/neutros 2,5 mM (Amino acid standards: acidics and neutrals A6407, Sigma-Aldrich), aminoácidos básicos 2,5

mM (Amino acid standards: basics A6282, Sigma-Aldrich), glutamina 5 mM y TCA al 20% con 2 mM de norleucina. Las muestras se secaron al vacío en una centrífuga termostregulada, seguidamente se añadió la solución de resecado (metanol/acetato sódico 1 M/trietilamina, 2:2:1) a las muestras y se volvieron a secar en vacío. A continuación, se añadió el reactivo de derivación (metanol/agua Milli-Q®/trietilamina/fenilisotiocianato, 7:1:1:1).

Para la determinación de los aminoácidos en el cromatógrafo, se utilizó una columna C18-4 μm Waters Pico-Tag (300 mm x 3,9 mm; Ref. WAT010950, Waters Cromatografía, SA, España) a una temperatura constante de 46°C y un gradiente multietapas de dos eluyentes (Tabla 3.4). El eluyente A fue una mezcla de acetato de sodio trihidratado 68 mM (pH 6,45) y acetonitrilo (97,5:2,5, v/v); y el eluyente B fue agua Milli-Q® y acetonitrilo (40:60, v/v).

Tabla 3.4
Gradiente utilizado en la determinación de aminoácidos libres

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	1	0	100
18,5	1	3	97
29	1	6	94
35	1	9	91
55	1	34	66
67	1	34	66
67,5	1	100	0
71,5	1	100	0
72	1	0	100
75	1	0	100

Para la determinación de los aminoácidos hidrolizados, así como para los libres en plasma se utilizó un sistema de gestión de cromatografía Millennium 32 para el control del gradiente y el procesamiento de datos. La identificación de los aminoácidos se hizo a partir de los tiempos de retención de los picos del patrón. Se intercalaron patrones de distinta concentración entre las muestras para corregir las posibles derivas en los tiempos de retención y cuantificar la concentración de aminoácidos a partir de una recta de calibrado con distintas concentraciones de cada aminoácido utilizando la norleucina y α -aminoadípico como patrones internos.

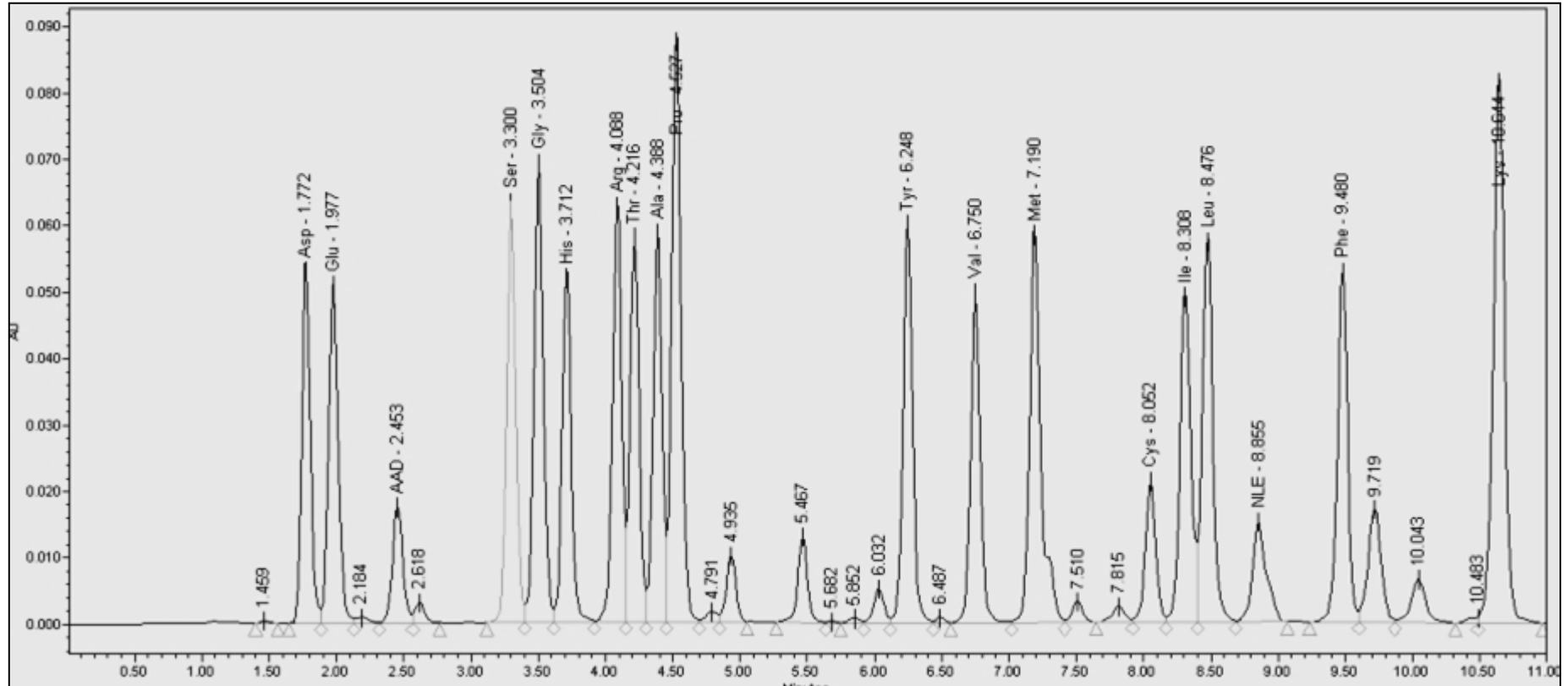


Figura 3.8 Cromatograma de los aminoácidos procedentes de un hidrolizado de proteína

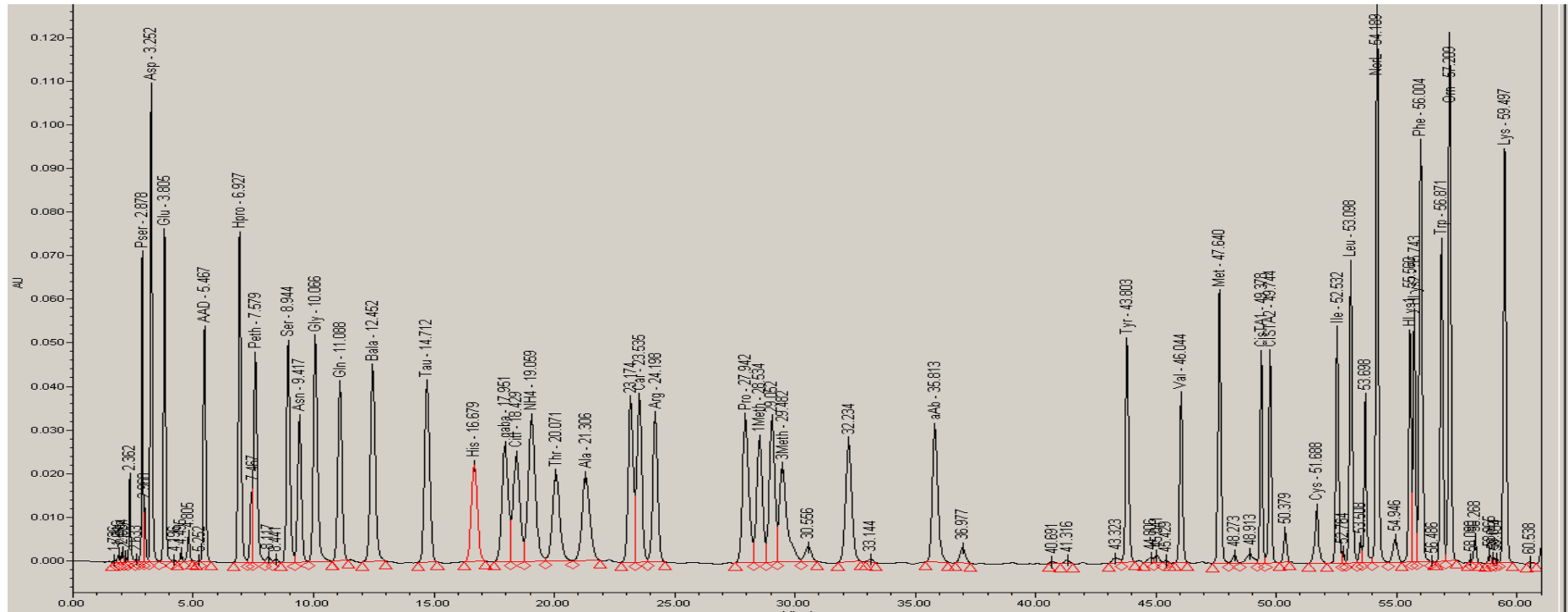


Figura 3.9 Cromatograma de los aminoácidos libres presentes en una muestra de plasma

3.2.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para el análisis del perfil de ácidos grasos de muestras de canal y músculos se empleó la cromatografía de gases, que permite la separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en función de su afinidad por el relleno de la columna.

Extracción lipídica

El principio de extracción se basa en la capacidad de la mezcla de cloroformo-metanol para poder extraer tanto lípidos neutros como polares. El cloroformo es el disolvente apolar más usado para solubilizar lípidos. Pero algunos lípidos complejos, generalmente constituyentes de membrana (como los fosfolípidos), se encuentran asociados a proteínas y polisacáridos y presentan un carácter más polar, siendo necesario para disolverlos solventes ligeramente más polares, como el metanol. Para la extracción de lípidos seguimos el método Folch (Folch y col., 1957) modificado. Pesamos una cantidad de 0,3 gramos de muestra liofilizada en tubos de vidrio Pyrex de 10 ml, y añadimos 2,7 ml de mezcla Folch (cloroformo:metanol, 2:1 y 0,05% de butilhidroxitolueno (BHT)) y 300 µl de patrón interno C23:0 (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Suecia) disuelto en cloroformo a razón de 4 mg/ml. Las muestras se sometieron a sonicación durante 15 minutos en baño de ultrasonidos. Se mantuvieron durante 24 horas macerando a 4°C. Se centrifugaron a 500 g durante 20 minutos a 4°C, y el contenido se filtró a través de papel Whatman nº 1. Una vez extraídos los lípidos se han de saponificar para liberar los ácidos grasos, para ello se añadió 1,5 ml de NaCl al 0,9% sobre el filtrado y se centrifugó a 500 g durante 20 minutos a 10°C. Una vez realizada la centrifugación, la fase superior acuosa se desecha con pipeta Pasteur y la fase inferior se secó al vacío en una centrífuga termorregulada (SpeedVac, SPD131DDA-230, Thermo, Milford, MA, EE.UU). Realizada la extracción, se suspendió de nuevo el extracto final en 500 µl de heptano. Si la metilación no se va hacer a continuación, las muestras se gasean con N₂ y se almacenan a - 20°C hasta la metilación de los ácidos grasos.

Metilación de ácidos grasos

La metilación de los ácidos grasos se llevó a cabo por el método de Kramer y Zhou (2001) modificado. Se mezclaron en un tubo de 10 ml de vidrio Pyrex, 100 µl del

extracto lipídico resuspendido en heptano, 100 µl de patrón interno C15:0 (P6125-1G, Sigma Aldrich, Madrid, España), a una concentración de 1 mg/ml, y 1,5 ml de solución NaOH 0,5 N. Esta mezcla se llevó a un baño a 50°C durante 15 minutos. A continuación se añadió 1,5 ml de HCl al 5% y se volvió a llevar al baño a 50°C durante 1 hora, tras lo cual se añadió a la mezcla 500 µl de heptano y 500 µl de agua Milli-Q®. La mezcla se centrifugó a 1500 g, durante 5 minutos, a 4°C. La fase superior del tubo se recogió y evaporó hasta su totalidad en una centrífuga termorregulada. Por último, se resuspendió en 250 µl de heptano y se almacenó en viales a - 20°C hasta su posterior análisis en cromatógrafo de gases.

Identificación de ácidos grasos

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se separaron y cuantificaron en un cromatógrafo de gases Focus GC (Thermo Scientific, Milán, Italia), dotado de detector de ionización de llama, inyector automático y con una columna capilar de silica gel (TR-CN100 Teknokroma, Barcelona, España) de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm. Como gas transportador se utilizó helio. El perfil de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se determina en 1 µl de muestra en modo “split” 1:50 usando el programa de gradiente de temperatura descrito por Shingfield y col. (2003). La temperatura de la columna se mantiene a 70°C durante 4 minutos, seguida de un aumento de temperatura de 8°C/minuto hasta alcanzar 110°C. Sigue un aumento de temperatura de 5°C/minuto hasta alcanzar 170°C, temperatura que se mantiene durante 10 minutos. El programa finaliza con un aumento de 4°C/minuto hasta alcanzar la temperatura final de 240°C, temperatura que se mantiene durante 14,5 minutos. Los picos de ácidos grasos se identificaron utilizando estándares puros de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (47885-U, Sigma Aldrich, Madrid, España) y el programa de software Chrom-Car (Thermo Scientific, Milán, Italia). Los resultados se expresaron como porcentajes del total de ésteres metílicos de los ácidos grasos identificados.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE MINERALES

La determinación de los minerales se realizó previa mineralización húmeda de las diferentes muestras al someterlas a un tratamiento ácido a elevadas temperaturas (180-200°C), inicialmente con HNO₃ durante aproximadamente 1 hora, y

posteriormente con una de mezcla $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ 1:4 hasta conseguir la total eliminación de la materia orgánica. La mineralización se realizó disponiendo las muestras en frascos adecuados resistentes al calor en un baño de arena (J.R. Selecta, S.A., COMBIPLAC, nº serie 0373930). Seguidamente se diluyeron con agua Milli-Q® para su posterior medida en espectrofotometría de absorción atómica, en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Analyst 700). Para el caso del fósforo, la cuantificación se realizó por colorimetría a 820 nm (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, USA) mediante el método del vanadomolibdato (AOAC, 2000).

Se prepararon soluciones estándar de todos los minerales de concentración 1 g/L utilizando ampollas Tritisol (Merck, Darmstadt, Alemania), a partir de las cuales se obtuvieron las correspondientes curvas patrón. Para la realización de la curva patrón de fósforo se utilizó KH_2PO_4 (fosfato monopotásico). Para las determinaciones de calcio y magnesio se adicionó lantano al 0,3% (LaCl_3 , Merck) tanto en las muestras como en los estándares para evitar posibles interacciones. Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado en todas las muestras.

Para evitar la presencia de minerales, todo el material utilizado en el laboratorio fue lavado con ácido nítrico 0,1 M y enjuagado con agua Milli-Q®. A la hora de realizar un control de la exactitud en la determinación de los distintos minerales se emplearon diferentes patrones de referencia externos, cuyos valores certificados y determinados se recogen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5

Valores certificados y determinados para los patrones externos (Community Bureau of Reference, B.C.R.)

Mineral	Patrón	Referencia	Valor certificado	Valor determinado
Ca (mg/g)	Polvo de leche	B.C.R. Ref.: nº 63	13,49 ± 0,11	13,47 ± 0,04
Mg (mg/g)			1,26 ± 0,02	1,29 ± 0,02
P (mg/g)			11,10 ± 0,13	11,04 ± 0,03
Fe (µg/g)	Riñón de cerdo liofilizado	B.C.R. Ref.: nº 186	214 ± 5	215,6 ± 5
Cu (µg/g)	Hígado liofilizado	B.C.R. Ref.: nº 185R	189 ± 4	192,1 ± 5
Zn (µg/g)			142 ± 3	146,3 ± 2

Asimismo, la precisión de los análisis de los minerales estudiados se controló mediante el cálculo del coeficiente de variación interensayo (%). Se obtuvieron los siguientes valores: Ca, 2,07; Mg, 5,16; P, 0,73; Fe, 3,21; Cu, 6,90, y Zn, 1,93.

3.2.5 MEDIDAS DE COLOR EN EL MÚSCULO. COORDENADAS CIELAB (L^* , a^* y b^*)

Con el fin de obtener una serie de parámetros totalmente objetivos en la medida del color en distintos materiales, la Comisión Internacional de l'Éclairage (CIE) ha ido desarrollando desde 1931 diferentes métodos. El método considerado como más fiable para la reproducción real del color de un objeto iluminado por la luz del día es el sistema CIELAB. El espacio de color $L^*a^*b^*$ fue modelado en base a una teoría de color oponente que establece que dos colores no pueden ser rojo y verde o amarillo y azul, al mismo tiempo. Como se muestra a continuación, L^* indica la luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas cromáticas (Fig. 3.10).

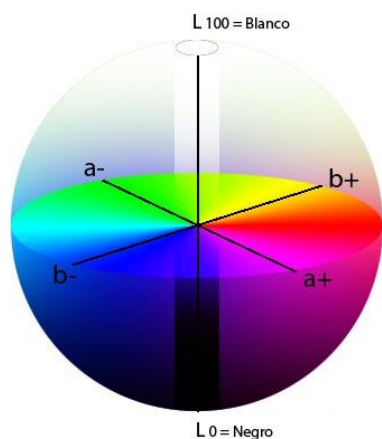


Figura 3.10 Coordenadas CIELAB

L^* : Luminosidad. Este parámetro varía desde el 0 (negro) al 100 (blanco). Nos permite distinguir la carne pálida de la oscura.

a^* : coordenada cromática rojo/verde. Los valores de este índice pueden ser negativos ($-a^*$) indicando verde, o positivos ($+a^*$) indicando rojo.

b^* : coordenada cromática amarillo/azul. Estos valores también pueden ser negativos ($-b^*$) indicando azul, o positivos ($+b^*$) indicando amarillo.

Cuando se clasifican los colores, se los puede expresar en términos de matiz (color), luminosidad (brillo) y saturación (vividez). A partir de los parámetros $L^*a^*b^*$, se calculan el índice Croma (C^*), que indica la saturación, y el ángulo hue (h°), que indica el tono o matiz, cuyas fórmulas aparecen a continuación:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Índice Croma (C*)

$$h^\circ = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Ángulo hue (h°)

A las 24 h *post-mortem*, una vez separados los músculos *Longissimus thoracis* y *Biceps femoris* de la semicanal, se realizó el corte de una rodaja de cada músculo a nivel de la última costilla (primera lumbar). Las muestras se dejaron durante 15 minutos de aireado a 4°C para permitir la captación de oxígeno a la superficie expuesta. Antes de realizar ninguna determinación el equipo debe ser calibrado con un azulejo blanco. Esta calibración debe basarse en un patrón negro como $L^* = 0$ y blanco como $L^* = 100$. La medición de los índices $L^*a^*b^*$ se realizó en zonas homogéneas y representativas de la muestra, libres de grasa intramuscular y de manchas de sangre. Las coordenadas de color CIE Lab fueron obtenidas a partir de una media de 3 mediciones con un colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Corp., Japón).

3.2.6 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y HORMONAS

Los metabolitos plasmáticos se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (León, España). Se analizaron las concentraciones de glucosa, creatinina, urea, colesterol total, y triglicéridos mediante colorimetría, utilizando un analizador Cobas Integra 400 analyzer (Roche Diagnostics, Madrid, España).

La determinación de la concentración de las hormonas plasmáticas fue llevada a cabo en la unidad de Radiobioquímica e Inmunoanálisis del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Granada, España). La cuantificación de las hormonas en plasma se midió usando Kits comerciales de radioinmunoensayo (RIA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La radioactividad en las muestras se midió utilizando un contador gamma (Behring 1612, Nuclear Enterprises Ltd, Edimburgo, Escocia). Las referencias de los kit comerciales para cada hormona analizada y las características del ensayo como el coeficiente de variación intra-ensayo y la sensibilidad del método (nivel mínimo al que se puede detectar un metabolito) aparecen descritas en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6

Referencias de los kit comerciales de las hormonas analizadas y características de los ensayos

	Número de catálogo	Proveedor	Coefficiente de variación intra-ensayo	Sensibilidad
Insulina	PI - 12K	EMD Millipore Corporation, Madrid, España	6,54 %	1,611 μ U/ mL
Leptina	XL-85K		5,47 %	0,801 ng / mL
Grelina total	GHRT-89HK		6,75 %	93 pg / mL
Grelina activa	GHRA-88HK		10,20 %	7,8 pg / mL
IGF-1	IGF-R20	Mediagnost, Reutlingen, Alemania	4,15 %	0,02 ng / L

3.2.7 DETERMINACIÓN DE L-CARNITINA

El análisis de la concentración de L-carnitina se realizó en plasma y en homogenados de músculo usando un kit comercial (L-Carnitine enzymatic UV- Test; ref. 242008001, Roche, Madrid, Spain) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones.

Para los músculos, se pesaron 0,1 g de muestra y se añadió 5 ml de agua y 0,5 ml de ácido perclórico 1 M. El ácido ayuda a precipitar las proteínas. Posteriormente, la muestra fue sonicada para romper las paredes celulares. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y a 4°C y se ajustó el pH a 7 con fosfato potásico. En el caso del plasma usamos 1 ml de suero con otro 1 ml de ácido perclórico 0,6 M y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos. Se ajustó el pH a 7,5 con carbonato potásico. Las muestras fueron guardadas y conservadas a - 20°C hasta su análisis.

Una vez preparadas las muestras se usan los reactivos que componen el kit, de acuerdo con las especificaciones del mismo. El método consiste en desencadenar una serie de reacciones que comienzan con la acetilación de la L-carnitina, que implican, en último término, el consumo de NADH (Fig. 3.11). Se mide la desaparición de esta coenzima mediante espectrofotometría a 340 nm.

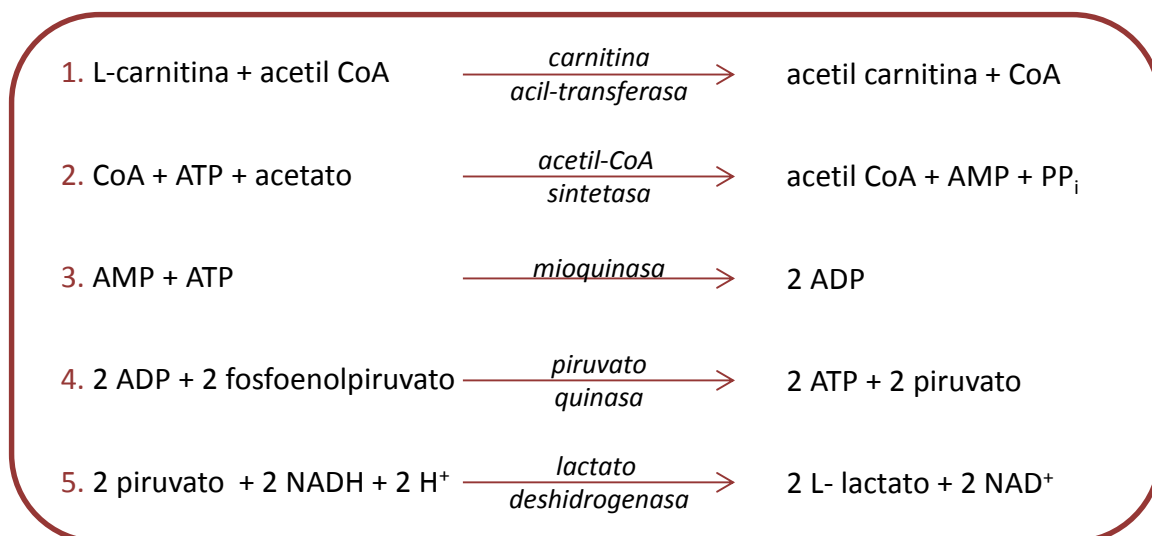


Figura 3.11 Reacciones que intervienen en el proceso desde la acetilación de la L-carnitina hasta el consumo de NADH

Una vez obtenidos los homogenados de la muestra, en una cubeta se adicionaron las dos soluciones proporcionadas por el kit con los sustratos (tampón Tris a pH 7, NADH, ATP, acetil CoA, fosfoenolpiruvato y acetato de magnesio) y las enzimas (la acetil-CoA sintetasa, la mioquinasa, la lactato deshidrogenasa y la piruvato quinasa) implicadas en la cascada de reacciones. Ambas soluciones se mezclaron junto al homogenado de la muestra. De manera paralela, se preparó una cubeta en blanco para cada serie de muestras con una cantidad idéntica de las soluciones del kit, pero sin la muestra. Seguidamente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (PharmaSpec UV 1700, Shimadzu) a 340 nm (A1). A continuación, se añadió la enzima carnitina acil-transferasa que desencadenó la cascada de reacciones, la absorbancia se midió por segunda vez transcurridos 30 minutos (A2), y una tercera vez a los 10 minutos de la segunda medición (A3). Tanto para el blanco como para la muestra se calculó la diferencia de absorbancia (ΔA). La absorbancia resultante del blanco se restó a la obtenida para la muestra.

$$[(A1-A2) - 3(A2-A3)]_{\text{muestra}} - [(A1-A2) - 3(A2-A3)]_{\text{blanco}}$$

Para obtener la concentración de L-carnitina de la muestra a partir del ΔA de la muestra (una vez restado el blanco) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{V_f * 161,2 * F}{6,3 * d * V_m * 2} * \Delta A = \text{mg de carnitina} / L$$

Donde V_f es el volumen final (ml) en la cubeta; V_m es el volumen de la muestra (ml) añadida a la cubeta; $161,2$ es el peso molecular de la L-carnitina (g /mol); F es el factor de dilución; $6,3$ es el coeficiente de extinción molar del NADH ($L * mmol^{-1} * cm^{-1}$); d es el grosor de la cubeta (cm); y 2 es debido a que se consumen dos moléculas de NADH por cada una de L-carnitina presente en la muestra.

La concentración de L-carnitina en mM se calculó a partir de la formula siguiente:

$$\frac{\text{mg de carnitina /L} * \text{Dilución (L)}}{\text{mg muestra} * 161,2} = \text{mM carnitina}$$

Donde la dilución y los mg de la muestra son los utilizados durante la preparación de la misma.

3.2.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD OXIDATIVA EN FIBRAS MUSCULARES

El estudio de la actividad oxidativa las fibras musculares se fundamenta en la presencia de actividad NADPH-diaforasa. Este nombre se aplica a cualquier enzima con la capacidad de transferir electrones entre el NADPH o NADH y distintos aceptores, entre los que se encuentran las sales de tetrazolio, como el nitroazul de tetrazolio (NBT). Cuando las sales de tetrazolio funcionan como aceptor de hidrógeno se reducen y forman moléculas insolubles y azuladas llamadas formazanos. Así, esta técnica pone de manifiesto cualquier deshidrogenasa que utilice NADPH como donador de hidrógenos y sales de tetrazolio como aceptor (Sheehan y Hrapchak, 1987). La mayor cantidad de mitocondrias presentes en las fibras oxidativas dan lugar a una mayor actividad oxidativa y formación de coenzimas NADH y NADPH. Por tanto, las fibras tipo I darán lugar con esta técnica un color más oscuro que las de tipo II.

Para la determinación de la abundancia de fibras oxidativas, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica anaPath (Granada, España). Las muestras del músculo *Longissimus dorsi* fueron fijadas en paraformaldehído inmediatamente después del sacrificio del animal. Posteriormente, se incluyeron en un molde con OCT (temperatura de corte óptima) y se congelaron mediante inmersión en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Se cortaron en secciones de 10 μm (5 réplicas por animal) mediante un criostato (CM1860, Leica Microsistemas

S.L.U., Barcelona, España) y se colocaron en portaobjetos de alta adherencia. La tinción se realizó siguiendo el protocolo descrito en Neuromuscular (2017).

Se añadió a los portaobjetos con la muestra una mezcla de solución de NBT y NADH. A continuación se incubaron las muestras en una placa de tinción de vidrio durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se lavó el portaobjetos con agua desionizada y con soluciones crecientes de acetona 30, 60 y 90 % para retirar el NBT no unido. Finalmente, se enjuagó con agua desionizada y se montaron los cubreobjetos. Las fibras musculares se observaron mediante un microscopio (Olympus CX41, Olympus Iberia, Barcelona, España).

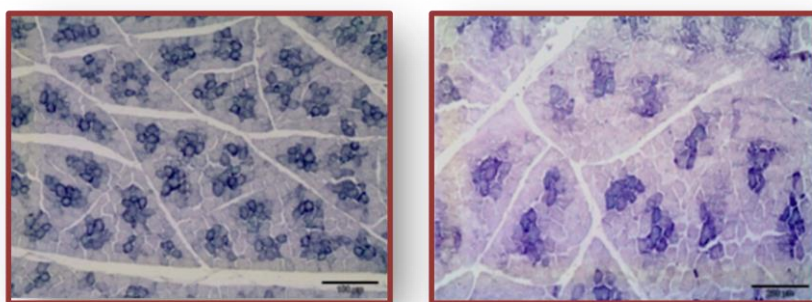


Figura 3.12 Imágenes tomadas a microscopio (200 µm) de tejido con alta actividad NADPH-diaforasa (izquierda) y otra muestra con menor actividad (derecha).

3.2.9 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS LIPOGÉNICAS

Las muestras de músculo y tejido adiposo dorsal fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después del sacrificio del animal, y se almacenaron a - 80°C hasta la preparación de los correspondientes homogenados, que fue similar en todas las muestras analizadas. En un tubo de 10 ml, se pesó alrededor de 1 g, al cual se añadió 4 ml de tampón de sacarosa 300 mM a pH 7,4. A continuación, las muestras se homogenizaron con ayuda de un homogenizador Ultra-Turrax® (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany), manteniendo los tubos en hielo y posteriormente, se centrifugaron a 20000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a - 80°C hasta su análisis.

Actividad de la enzima Ácido Graso Sintasa

La acción de esta enzima conduce a la formación de ácido palmítico a partir de malonil CoA y de acetil CoA en presencia de NADPH (Chang y col., 1967).



Para la determinación de la actividad enzimática, mezclamos en un tubo 1 ml de solución A (compuesta de NADPH 0,15 mM y acetil CoA en tampón fosfato potásico 100 mM a pH 6,5) y de 50 a 200 μl de sobrenadante. Preincubamos las muestras a 37°C en baño María durante 10 minutos. A continuación, para desencadenar la reacción, se añadió 100 μl de la solución B (malonil CoA 0,6 mM, en tampón fosfato potásico 100 mM a pH 6,5). La actividad de la enzima fue medida por el descenso de densidad óptica (DO) originado por la transformación del NADPH en NADP. El descenso del NADPH se determinó cada 60 segundos durante 10 minutos en un espectrofotómetro a 340 nm. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular una recta de regresión lineal.

Actividad de la enzima Mállica

La enzima mállica cataliza la reacción siguiente (Hsu y Lardy, 1969):



Para la determinación de la actividad enzimática, mezclamos en un tubo 500 μl de tampón de trietanolamina 400 mM; 100 μl de MnCl_2 120 mM; 200 μl de NADP 3,4 mM; 50 μl de Malato 30 mM y 2 ml de agua Milli-Q®. Preincubamos las muestras a 37°C en baño María durante 5 minutos. A continuación, para desencadenar la reacción, se añadió de 50 a 100 μl de sobrenadante, previamente preparado. La actividad de la enzima se midió por el aumento de densidad óptica (DO) procedente de la formación de NADPH. El aumento de NADPH se determinó cada 30 segundos durante 5 minutos en un espectrofotómetro a 340 nm. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular una recta de regresión lineal.

Actividad de la enzima Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa

La enzima cataliza la siguiente reacción (Fitch y col., 1959):



Para la determinación de la actividad enzimática, mezclamos en un tubo 3 ml de tampón de Gly-Gly 250 mM; 100 μl de MgCl_2 100 mM; 25 μl de glucosa 6 fosfato 200 mM; 50 μl de agua Milli-Q® y 50-100 μl de sobrenadante previamente preparado. Preincubamos las muestras a 37°C en baño María durante 5 minutos. A continuación, para desencadenar la reacción, se añadió 100 μl de NADP 13,9 mM. La actividad de la enzima se midió por el aumento de densidad óptica (DO) procedente de la aparición de NADPH. El aumento de NADPH se determinó cada 30 segundos durante 5 minutos en un espectrofotómetro a 340 nm. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular una recta de regresión lineal.

Cálculos y expresión de la actividad enzimática

Para todas las medidas de actividad enzimática se usó una muestra control o blanco. A partir de los valores de la diferencia de densidad óptica ($\Delta \text{DO} = \text{DO muestra} - \text{DO blanco}$) se calculó la pendiente de la recta (regresión lineal) para cada muestra. La siguiente fórmula permite calcular la actividad enzimática en nmoles NADPH/min/ml de sobrenadante.

$$\text{Actividad} = \frac{V_0/\text{min} * \text{Volumen total en la cubeta (ml)} * 10^6}{\text{Volumen de muestra} (\mu\text{l}) * 6,3}$$

Donde V_0/min equivale al valor de la pendiente y **6,3** se refiere al coeficiente de extinción molar del NADPH ($\text{ml} * \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

Para estandarizar la actividad enzimática, se suele expresar en relación a la cantidad de proteína o de tejido utilizado en la preparación del homogenado de la muestra. La concentración de proteína en el homogenado la analizamos por el método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951), mediante un kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Ref., 23225-23227, Thermo Scientific). Para obtener la

actividad en nmoles de NADPH/min/g de tejido, es suficiente con multiplicar la actividad anterior por la dilución aplicada al tejido en el tampón de homogenización.

3.2.10 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para la cuantificación de la expresión de los genes que codifican las enzimas lipogénicas estudiadas usamos muestras procedentes de la grasa dorsal subcutánea y de los músculos *Biceps femoris* y *Longissimus dorsi*. Las muestras se recogieron inmediatamente después del sacrificio de los animales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARN.

Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de 50 - 100 mg de muestra de cada uno de los tejidos estudiados en cada animal. La homogenización fue similar en todas las muestras analizadas. En un tubo eppendorf de 2ml, se pesó la muestra, a la que se añadió 1 ml de solución TRIzol (tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, Invitrogen, CA, USA) para mantener la integridad del ARN durante la homogeneización, al mismo tiempo que se altera la estabilidad de las células y disuelven los componentes celulares. A continuación, las muestras se homogenizaron con ayuda de un homogenizador Ultra-Turrax®, durante 20 - 30 segundos manteniendo los tubos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante.

El sobrenadante se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de complejos de nucleoproteína antes de añadir 200 µl de cloroformo. La solución se mezcló brevemente, se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase acuosa y se añadió etanol al 70% en un volumen 1:1 de acuerdo con la cantidad de sobrenadante recogido. Esta mezcla se traspasó a una columna de filtrado (RNeasy Mini-columna Qiagen, Reino Unido) y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. El eluido obtenido se descartó. La columna se lavó dos veces con dos tampones incluidos en el kit (Buffer RW1 y RPE) con sendas centrifugaciones. Finalmente, el ARN unido a la columna se trató con 30 - 50 µL agua libre de ARNasa (Qiagen, Reino Unido) y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto a

temperatura ambiente. La cantidad de ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington), y la integridad de ARN se analizó usando el sistema Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, CA). Los valores de integridad RQI (RNA quality indicator) oscilaron entre 6,8 y 8,6, para el tejido adiposo dorsal y entre 7 y 9,6 para los músculos.

Transcripción inversa

A partir de un 1 µg de ARN extraído se sintetizó la cadena de cADN mediante transcripción inversa y utilizando un kit comercial (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Reino Unido) de acuerdo con las indicaciones del fabricante

Expresión génica

Los análisis de expresión génica se llevaron a cabo en colaboración con el Departamento de Mejora Genética Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.

Los pares de cebadores utilizados para la cuantificación se diseñaron usando el software Primer Select (DNASTAR, Wisconsin, EE.UU.) a partir de las secuencias para porcino que están disponibles en GENBANK y o ENSEMBL, cubriendo diferentes exones para asegurar la amplificación del cDNA. Las secuencias de los cebadores y las longitudes de los amplicones se indican en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7

Cebadores diseñados para la qPCR para cada uno de los genes estudiados

Nombre del gen	Símbolo	GenBank Acc. Number	Forward primer	Reverse primer	Tamaño pb
Fatty acid synthase	FASN	NM001099930	GCAGGCGCGTGA TGGGAATGGTG	GCCCGAGCCCGA GTGGATGAGCA	206
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	XM003360515	AGGCCGTGTACAC CAAGATGATGA	TTGTGCAGCAGC GGCGTGAAGA	220
Malic Enzyme	ME1	X93016	GCCGGCTTTATCC TCCTCT	TCAAGTTTGGTCT GTATTTCTGG	223

Se llevaron a cabo PCRs estándar en cDNA para verificar el tamaño de los amplicones. La amplificación, la detección de la señal y el análisis de datos se

realizaron en el equipo LightCycler480 (Roche, Basilea, Suiza) en placas de reacción de 384 pocillos. La cuantificación del transcrito se realizó utilizando la mezcla SYBR Green (Roche, Basilea, Suiza). Para llevar a cabo el proceso de amplificación se preparó en un eppendorf con un volumen total de 20 μl , que contenía 2,5 μl de cDNA (en una dilución 1/20), 10 μl de la mezcla SYBR Green y 0,15 μM tanto de cebadores directos como inversos. Como controles negativos, se utilizaron mezclas sin cDNA. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 seg a 95°C, y por último, 1 minuto a 60°C, momento en el cual se determinó la fluorescencia. Finalmente, se generó una curva de disociación para probar la especificidad de la PCR, obtenida mediante un ciclo de 15 seg a 95°C, seguido de 20 seg a 60°C y una rampa de 0.01 °C/seg hasta 95°C.

Los datos se analizaron con el software LyghtCycler480 SW1.5 (Roche, Basilea, Suiza). Todos los puntos y muestras se realizaron por triplicado, y para cada réplica se realizó su correspondiente curva de disociación. Los picos únicos en las curvas de disociación confirmaron la amplificación específica de los genes.

El análisis estadístico de los datos de expresión génica se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Steibel y col. (2009), que consiste en el análisis del número de ciclos para alcanzar el valor umbral (C_p), tanto para el gen de interés como para los genes endógenos, utilizando un modelo lineal mixto. El siguiente modelo se utilizó para analizar la expresión conjunta de los genes de interés y de control en diferentes tejidos:

$$Y_{gijk r} = TG_{gi} + GG_{gj} + B_{gjk} + D_{ijk} + e_{gijk r}$$

donde $Y_{gijk r} = -\log_2 \left(E_g^{-C_{p_{gijk r}}} \right)$,

E_g es la eficiencia de la PCR para el gen g th,

$C_{p_{gijk r}}$ es el valor obtenido del software del termociclador para el gen g th de la réplica r th en una muestra recogida del animal k th, del genotipo j th, alimentado con el tratamiento dietético i th,

TG_{gi} es el efecto específico del tratamiento dietético i th sobre la expresión del gen g th,

GG_{gi} es el efecto específico del genotipo j th sobre la expresión del gen g th,

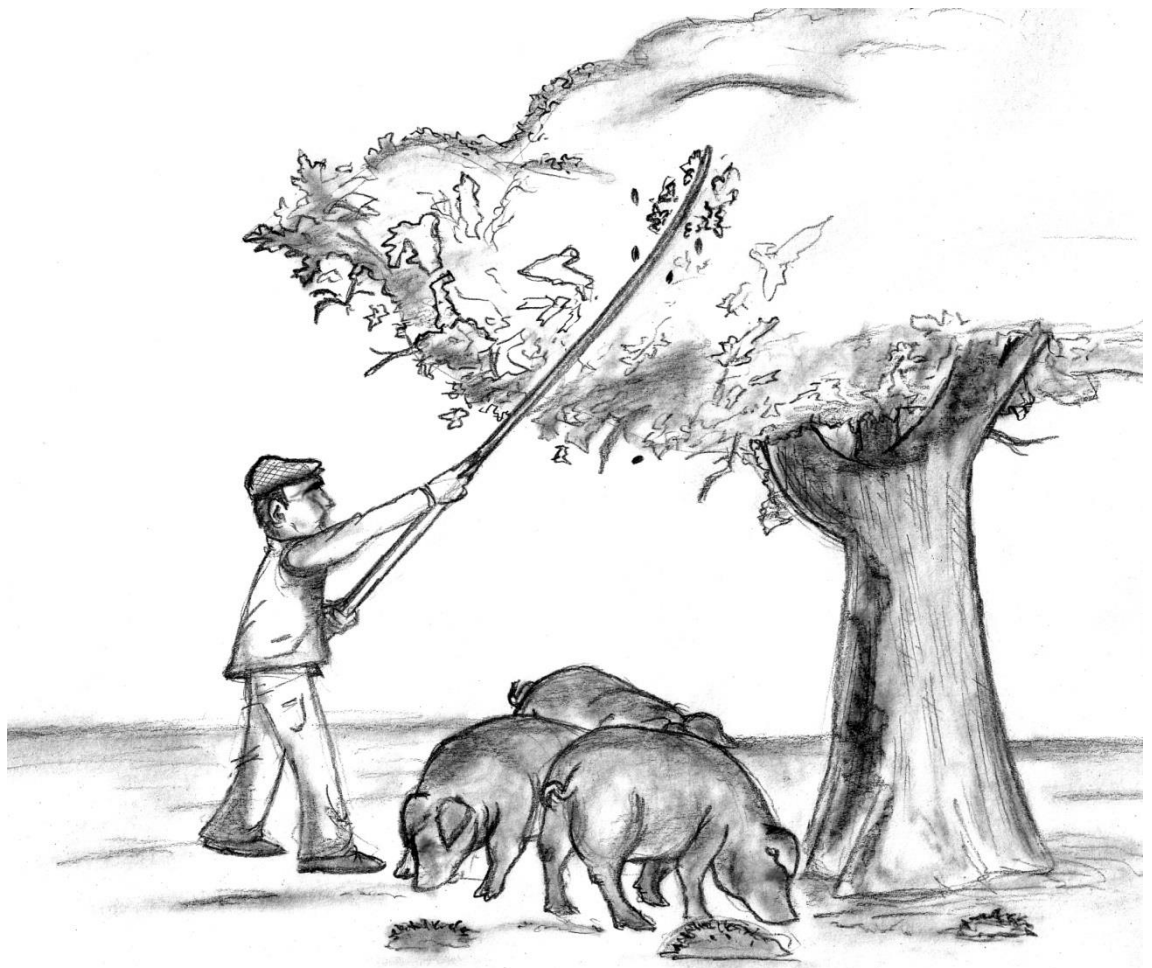
B_{gjk} es el efecto aleatorios específico del cerdo k th del genotipo j th en la expresión del gen g th,

D_{ijk} es un efecto aleatorio específico de la muestra común para todos los genes,
y

e_{gijklr} es un efecto residual.

Para comprobar las diferencias en la tasa de expresión de los genes de interés ($diff_{TG}$) entre las clases normalizadas por los genes de referencia, se realizaron diferentes análisis de contraste entre las respectivas estimaciones de los niveles de TG y GG. El nivel de significación de las estimaciones $diff_{TG}$ se determinó con el estadístico t. Para obtener los valores del número de veces de expresión diferencial (FC) a partir de los valores estimados de $diff_{TG}$, se aplicó la siguiente ecuación: $FC = 2^{-diff_{TG}}$. Se calcularon intervalos de confianza (IC) del 95% asimétrico para cada valor FC utilizando el error estándar (SE) de la diferencia estimada: IC del 95% desde $2^{[-diff_{TG} + (1,96 \times SE)]}$ a $2^{[-diff_{TG} - (1,96 \times SE)]}$. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Similar effects of lysine deficiency in muscle biochemical characteristics of fatty and lean piglets

Patricia Palma-Granados, Ana Haro, Isabel Seiquer, Luis Lara, José F. Aguilera and Rosa Nieto

Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain



Journal of Animal Science 2017. 95:1–13

doi:10.2527/jas2017.1364

Received January 3, 2017

Accepted April 30, 2017

ABSTRACT

The main objective of this work was to investigate the effects of feeding Lys-deficient diets on muscle biochemical characteristics, particularly intramuscular fat concentration and fatty acid profile, in a fatty (Iberian) and a conventional pig genotype (Landrace × Large White [LDW]) maintained in identical experimental conditions. Performance and plasma metabolite changes were also monitored. Twenty-eight barrows of 10 kg initial BW, 14 of Iberian and 14 of LDW breed, were randomly assigned to each of 2 experimental diets in a 2 × 2 factorial arrangement (2 breeds × 2 diets). Seven pigs were allocated to each treatment combination. Diets (isonitrogenous and isoenergetic; 200 g CP /kg DM and 14.7 MJ ME) based on barley, corn, corn gluten meal and soybean meal, with identical composition, except for their Lys content (10.9 g/kg, for the diet adequate in Lys, and 5.2 g/kg for the diet deficient in Lys) were assayed. Pigs were housed in individual 2 m² pens and fed at 85% of ad libitum intake of the Iberian genotype, of greater intake capacity. Daily feed allowance was based on BW individually measured each week. At 25 kg BW, pigs were slaughtered by exsanguination after electrical stunning. Blood samples were taken and longissimus dorsi and biceps femoris muscles were rapidly dissected and stored frozen prior to analysis. Performance was reduced in both pig breeds when fed Lys-deficient diets, particularly in LDW pigs (breed × diet interaction; $P < 0.05$). Intramuscular fat content increased in longissimus dorsi of Iberian ($P < 0.05$) and in biceps femoris of both pig genotypes ($P < 0.01$) when fed Lys-deficient diets. Oleic acid increased ($P < 0.05$) and PUFA acid decreased ($P < 0.01$) in longissimus dorsi and biceps femoris of pigs of both genotypes fed Lys-deficient diets. The proportion of oxidative fibers ($P < 0.001$) and free L-carnitine content ($P < 0.05$) increased in longissimus dorsi of both pig types fed Lys-deficient diets. Plasma creatinine was greater in LDW pigs compared with Iberian pigs ($P < 0.01$). Urea and total cholesterol increased in pigs consuming Lys-deficient diets ($P < 0.01$). The plasma free L-carnitine concentration was higher in Iberian pigs than in LDW pigs ($P < 0.059$). No changes in plasma L-carnitine status due to dietary Lys supply were detected. Feeding Lys-deficient diets could be a suitable strategy for increasing intramuscular fat content in fatty and lean pigs.

Keywords: fatty acids, intramuscular fat, lysine deficiency, muscle, pig genotype

INTRODUCTION

Previous studies have shown that the detrimental effects on growth and body protein retention of dietary Lys deficiency were less pronounced in Iberian gilts than in Landrace gilts of similar BW reared under similar conditions (Rivera-Ferre et al., 2006). Additionally, a reduced intake of dietary Lys –maintaining constant the CP content of the diet- has been shown to increase intramuscular fat (**IMF**) in finishing gilts (Katsumata et al., 2005) and barrows (Tous et al., 2014), a trait generally linked to meat tenderness and juiciness (Wood et al., 2008). It has also been reported that pigs fed Lys-deficient diets showed changes in muscle metabolism, such as increased proportions of oxidative fibers in longissimus dorsi and rhomboideus muscles (Katsumata et al., 2008) and a decreased concentration of free L-carnitine (synthesized from Lys and Met) in longissimus dorsi (Katsumata et al., 2005) in comparison with pigs fed diets of adequate Lys content, although the mechanisms involved are not fully understood (Katsumata et al., 2008; Katsumata, 2011). On the other hand, in comparative studies with fatty and lean pigs, increased IMF in longissimus lumborum linked to reduced Lys intake has been shown in lean but not in fatty pigs (Madeira et al., 2013). Therefore, it seems relevant to elucidate the effectiveness of this nutritional approach to increase IMF in fatty pigs in which the production of fresh and cure products with high levels of IMF is highly desirable as well as to gain further insight on metabolic changes occurring at muscle and whole-body level.

With this background, the objective of the present work was to further investigate the effect of dietary Lys deficiency on muscle characteristics (IMF concentration, fatty acid profile, proportion of oxidative fibers and L-carnitine content) and metabolites changes (plasma metabolites and hormones) in a fatty (Iberian) and a conventional pig genotype (Landrace × Large White [**LDW**]) maintained under similar experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures and animal care were carried out according to Spanish Ministry of Agriculture guidelines (RD53/2013). Experimental protocols were approved by the Ethical Committee of the Spanish National Research Council (Consejo

Superior de Investigaciones Científicas; Madrid, Spain) and the competent local authority (Junta de Andalucía, Spain).

Animals, Experimental Design, Diets and Feeding

The experiment was performed with 14 purebred Iberian barrows (Silvela strain), a nonselected autochthonous fatty pig type, and 14 LDW barrows from a commercial lean cross, supplied by Sanchez Romero Carvajal, Jabugo S.A. (El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain) and Granja “La Alcubilla” (Moclín, Granada, Spain), respectively, selected at random from 8 and 7 litters of the same age, respectively. Pigs were housed in individual pens of 2 m² in an environmentally controlled room. Initial BW was 10.3 ± 0.3 and 10.4 ± 0.3 kg and corresponding age was 58 and 50 d, for Iberian and LDW pigs, respectively. Animals from both breeds were randomly assigned to each of 2 experimental diets in a 2 × 2 factorial arrangement (2 breeds × 2 diets) with 7 pigs per treatment combination. Diets (Table 1) were isonitrogenous and isoenergetic containing 200 ± 1 g CP/kg DM and 14.7 ± 0.1 MJ ME/kg DM. Diet **AL** (adequate in lysine) was adequate in AA and rest of dietary nutrients (10.9 g Lys/kg diet; NRC, 1998), and diet **DL** (deficient in lysine) was of identical composition except for the Lys content (5.2 g Lys/kg). For the AL diet, synthetic lysine (L-Lys·HCl) was added to reach the required Lys level. For the DL diet, synthetic Lys was replaced by L-glutamate and glycine to maintain the same nitrogen concentration than in the AL diet. The rest of AA remained constant and in sufficient amounts (NRC 1998, Whittemore et al., 2003). Daily feed allowance was calculated based on piglets’ BW, individually measured each week, according to voluntary feed intake previously determined in our lab for Iberian piglets (Conde-Aguilera et al., 2011). Animals were fed at 85% of ad libitum intake of the Iberian genotype, of greater intake capacity (Morales et al., 2002). Feed refusals were collected daily, dried and weighed. Water was freely available.

Table 1

Ingredients and nutrient composition of experimental diets offered to Iberian and Landrace × Large White pigs

Item	Experimental diets ¹	
	AL	DL
Ingredients, g/kg as fed		
Corn	420	420
Barley grain, 2-row	340	340
Soybean protein concentrate, 65% CP	35	35
Corn gluten meal	112	112
Dibasic calcium phosphate	17	17
Calcium carbonate	6.6	6.6
NaCl	5	5
Vitamin/mineral pre-mix ²	3	3
L-Lys·HCl, 78.8%	8.16	-
L-Thr, 98%	2.65	2.65
DL-Met, 99%	0.4	0.4
L-Trp, 98%	1.15	1.15
L-Val, 96.5%	1.8	1.8
L-Glu, 99%	-	4.08
Gly, 99%	-	4.08
Corn starch	47.14	47.14
Analyzed nutrient composition, g/kg DM		
CP	201	199
Lys	10.9	5.20
Met	3.77	3.70
Thr	9.61	9.58
Trp ³	2.40	2.40
Ile	6.73	6.58
Leu	22.4	22.5
His	5.17	5.00
Phe and Tyr	10.2	10.0
Val	10.3	10.3
Lipids	25.5	25.8
Total ash	49.5	51.0
GE, MJ/kg	18.66	18.53

¹AL = adequate in lysine (adequate in AA and rest of dietary nutrients [10.9 g Lys/kg diet]); DL = deficient in lysine (was of identical composition except for the Lys content [5.20 g Lys/kg]).

²Provided (per kg of complete diet): 3.38 mg retinol as retinyl acetate; 56.3 µg cholecalciferol. 25.2 mg DL- α -tocopherol as DL- α -tocopheryl acetate, 1.5 mg menadione as menadione sodium bisulfite, 0.15 mg thiamine, 3 mg riboflavin, 0.15 mg pyridoxine, 15 µg cyanocobalamin, 15 µg folic acid, 22.5 mg nicotinic acid, 15 mg D-pantothenic acid as calcium pantothenate, 15 mg Mn as MnSO₄·4H₂O, 75 mg Fe as FeSO₄·7H₂O, 120 mg Zn as ZnO, 450 µg I as KI, 60 mg Cu as CuSO₄·5H₂O and 300 µg Co as CoSO₄·7H₂O.

³Calculated (de Blas et al., 2010).

At approximately 25 kg BW, pigs were slaughtered by exsanguination after electrical stunning. Immediately after slaughter, the gastrointestinal tract and bladder were emptied and their contents discarded. The empty gut, blood, carcass, and other noncarcass parts, including organs, were separately weighed as previously described (Nieto et al., 2015). The longissimus dorsi and biceps femoris muscles from the left-half of carcass were rapidly dissected, weighed and stored at -20°C until analysis. Midline backfat measurements were made at the first rib, the last rib and the last lumbar vertebra. For assessment of the proportion of oxidative fibers, longissimus dorsi samples of 1cm³ from the right side of carcass were immediately frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen before storage at -80°C. Blood samples were taken in EDTA- containing tubes, immediately placed in an ice bath and centrifuged at 1,400 × g at 4°C for 20 min. Plasma was transferred into polypropylene tubes and stored at -80°C until analyzed. After partial thawing of the muscles stored at -20°C, they were cut into small pieces and ground in a mincer (Moulinex, Barcelona, Spain), and samples taken for freeze-drying and subsequent analysis.

Chemical analysis

All analyses were performed in duplicate. The following procedures were carried out according to the Association of Official Analytical Chemist (1990): DM content of feeds and muscles (method 934.01) and total ash of feeds (method 942.05). Total N in feeds and in freeze-dried samples of muscles was determined by combustion, according to the Dumas' method, in a TruSpec CN analyzer (Leco Corporation, St. Joseph, MI). Crude protein content was calculated using the factor of 6.25. Dry matter was determined on an aliquot sample of freeze-dried material to establish the residual water content after freeze-drying and the corresponding analytical result was expressed on a DM basis. Fat content in feeds were determined by ether extraction according to standard procedures (AOAC, 1990). Gross energy of feeds and freeze-dried muscle samples was determined in an isoperibolic bomb calorimeter (Parr Instrument Co., Moline, IL). Intramuscular fat content and fatty acid determination in muscle samples was performed as described in Nieto et al. (2015). Briefly, IMF was determined by extraction of 2 g of tissue with chloroform/methanol (2:1, v/v) according to Folch et al. (1957). Fatty acids in freeze-dried muscle samples were extracted as described by Folch et al. (1957), with small modifications. Methylation of fatty acids was performed following the procedure of Kramer and Zhou (2001), which

was slightly modified, in which 2 methylation procedures were used in each sample: NaOH/methanol at 50 °C for 15 min, followed by HCl/methanol at 50 °C for 1 h. Tricosanoic acid (C23:0; Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) was used as internal standard. Fatty acids methyl esters were identified by gas chromatography using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (Focus GC, Thermo Scientific, Milan, Italy) and a capillary column (Teknokroma TR-CN100, 100m by 0.25 mm i.d. and 0.20 µm film thickness, Teknokroma, San Cugat del Vallès, Barcelona, Spain). The temperature program used was 70 °C for 4 min, ramp of 8 °C/min to 110 °C, ramp of 5 °C/min to 170 °C, 10 minutes at 170 °C, ramp of 4 °C/min to 240 °C, and 14.5 minutes at 240 °C (total time 63 minutes). The injector and detector were maintained at 255° C. The carrier gas (helium) flow rate was 1.2 mL/min with a split ratio of 50, and 1µL was injected. Areas of peaks were quantified based on the reference standard mixture, with correction for recovery of the internal standard. The fatty acid profile was expressed as a percentage of identified fatty acids.

Plasma glucose, triglycerides, urea and creatinine, were determined colorimetrically using a COBAS INTEGRA 400 analyser (Roche Diagnostics, Madrid, Spain). Free L-carnitine content of plasma and muscle homogenates was determined using a commercially available kit (L-Carnitine enzymatic UV- Test, reference 242008001; Roche Diagnostics) following instructions from the manufacturer.

For determination of oxidative fiber abundance, samples were processed at Laboratorio de Anatomía Patológica Anapath (Granada, Spain). Serial cross-sections of 10 µm were cut on snap frozen longissimus dorsi muscle samples (5 per pig) on a cryostat (CM1860, Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Samples were stained by histochemical reactions for NADH enzymatic hydrogen transfer to a dye (tetrazolium which is converted to purple-blue formazan pigment; Sheehan and Hrapchak, 1987) to assess the proportion of oxidative fibers in each muscle. Muscle fibers were observed by a microscope (Olympus CX41, Olympus Iberia, Barcelona, Spain).

Hormones in plasma were measured using commercially available RIA kits following the directions of the manufacturer. Radioactivity in samples was measured using a γ counter (Behring 1612; Nuclear Enterprises Ltd, Edinburgh, Scotland). Serum insulin, leptin, IGF-1, and total and active ghrelin were quantified by using commercial RIA kits (Porcine Insulin RIA, catalog number PI-12K, Multi-Species Leptin RIA, catalog number XL-85K; Total Ghrelin, catalog number GHRT-89HK; and Active Ghrelin, catalog number GHRA-88HK, all from the same provider [EMD Millipore Corporation,

Madrid, Spain], and IGF-1 RIA catalog number IGF-R20 [Mediagnost, Reutlingen, Germany]). The intra-assay CV was 6.54% for insulin, 5.47% for leptine, 4.15% for IGF-1, and 6.75% for total and 10.2% for active ghrelin, respectively. Sensitivity for insulin, leptine, IGF-1, and total and active ghrelin was 1.611 microunits/mL, 0.801 ng/mL, 0.02 ng/L, 93 pg/mL and 7.8 pg/mL, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were assessed by ANOVA using the GLM procedure of SAS. The effects of genotype (Iberian and LDW), lysine content, and their interactions were included in the statistical model. Piglet was considered the statistical unit. When interaction between the main factors was significant, means from each of the 4 treatment combinations were compared by one-way ANOVA. Data on proportion of oxidative fibers in longissimus dorsi muscle was analyzed by a repeated measures 2-way ANOVA randomized design, with genotype and lysine content as main factors, using the MIXED procedure of SAS. Results are expressed as least squares means. Statistical significance was assessed by Tukey's t-test. The level of significance was set to 5%.

RESULTS

Piglets showed good health and normal behavior during the trials. When feed refusals occurred (in 2 DL Iberian piglets, 2 AL Iberian piglets, all DL LDW piglets, and 5 AL LDW piglets), refused feed was collected next morning, dried to a constant weight, and weighed to calculate actual feed intake. The amount of feed refused varied from 0.3 to 1.1%, from 0.3 to 10%, and from 3.4 to 22.5% of whole daily allowance, for Iberian, AL LDW, and DL LDW piglets, respectively.

Growth Performance and Carcass Measurements

Results on growth performance are shown in Table 2. Average DMI (g/d) was higher in Iberian piglets (11% on average, $P < 0.05$). Pigs consuming DL diets had, on average, 13% lower DMI than piglets consuming AL diets. The ADG did not differ between piglets of both genotypes consuming AL diets. For DL piglets, ADG was reduced by 32 and 51% for Iberian and LDW, respectively, compared with their

counterparts fed AL diets (genotype × diet interaction, $P < 0.05$). To correct for differences in BW, feed intake and growth rate were expressed also per kg BW (mean BW during the experiment, Table 2). In this case, DMI resulted similar among all groups, except for DL LDW piglets (13% lower; genotype × diet interaction, $P < 0.05$). Growth rate was in the order of AL LDW pigs > AL Iberian pigs > DL Iberian pigs > DL LDW pigs (genotype × diet interaction, $P < 0.001$). When pigs were fed AL diets, G:F was superior in LDW pigs (0.586 vs 0.516 for LDW and Iberian pigs, respectively, $P < 0.01$). In piglets fed DL diets, G:F dramatically decreased compared with AL pigs (by 28 and 40% in Iberian and LDW pigs, respectively; genotype × diet interaction, $P < 0.01$).

Table 2

Effects of genotype and dietary lysine content on performance of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	IB		LDW		SEM	<i>P</i> -value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × Diet
DMI, g/d	756	713	729	581	30	*	**	0.088
ADG	390 ^c	265 ^b	430 ^c	209 ^a	17	NS	***	*
DMI, g/kg BW·d ⁻¹	40.9 ^b	41.3 ^b	40.0 ^b	35.4 ^a	1.1	**	0.076	*
Growth rate, g/kg BW·d ⁻¹	21.1 ^c	15.4 ^b	23.4 ^d	12.6 ^a	0.7	NS	***	***
Days on experiment	41.6 ^b	52.6 ^c	37.4 ^a	55.8 ^c	1.4	NS	***	*
Final weight, kg	26.6	24.2	26.2	22.1	0.8	NS	***	NS
G:F	0.516 ^b	0.372 ^a	0.589 ^c	0.356 ^a	0.014	0.058	***	**
Carcass yield, g/kg EBW ³	659	647	669	655	4	0.058	**	NS
Carcass length, cm	51.1	50.0	53.4	51.1	0.73	*	*	NS
Backfat depth, cm								
First rib	2.41	3.29	1.89	2.17	0.25	**	*	NS
Last rib	1.20	1.07	0.87	0.70	0.11	**	NS	NS
Last lumbar vertebra	1.27	1.29	0.74	0.70	0.11	***	NS	NS

^{a-d} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Initial BW 10.3 ± 0.3 kg and 10.4 ± 0.3 kg for Iberian and Landrace pigs; n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian; LDW = Landrace × Large White; ¹AL = adequate in lysine (adequate in AA and rest of dietary nutrients [10.9 g Lys/kg diet]); DL = deficient in lysine (was of identical composition except for the Lys content [5.20 g Lys/kg]).

²Gen = genotype; NS = not significant.

³EBW = empty body weight.

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

Carcass yield (g/kg empty body weight) tended to be higher ($P = 0.058$) and carcass length was higher in LDW pigs ($P < 0.05$). Both parameters were reduced in pigs fed DL diets ($P < 0.05$). Backfat depth measurements were greater in Iberian pigs ($P < 0.01$). Backfat at the first rib increased in pigs fed DL diets ($P < 0.05$). The rest of backfat measurements were not modified by dietary treatments ($P > 0.05$).

Muscle Biochemical Composition

Weight and nutrient composition of longissimus dorsi and biceps femoris muscles are shown in Table 3. Muscle weights were influenced by both genotype and Lys deficiency. In the case of longissimus dorsi, muscle weight was 18 to 20 % lower in Iberian pigs than in LDW pigs (expressed as g, or g/kg empty body weight, $P < 0.01$). In both pig genotypes, DL diet caused a deep decrease in longissimus dorsi weight (25 to 35% decrease compared with AL fed pigs, $P < 0.01$). Protein concentration (g/kg) was higher in Iberian than in LDW pigs fed AL diets, and decreased when DL diets were offered, particularly in Iberian pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). Water content (g/kg) was higher in LDW pigs ($P < 0.001$) and increased in pigs fed DL diets ($P < 0.05$). The water:protein ratio tended to be higher in LDW pigs ($P = 0.087$) and increased in both genotypes when consuming DL diets ($P < 0.001$). Intramuscular fat in longissimus dorsi noticeably increased in Iberian pigs fed DL diet (35.8 vs 64.6 g/kg) but was not significantly modified in DL LDW pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). The ash content of longissimus dorsi muscle was not changed by genotype or Lys deficiency ($P > 0.05$). Energy content (MJ/kg) was higher in longissimus dorsi of Iberian pigs (by 21%; $P < 0.001$) and was not modified by dietary treatments ($P > 0.05$).

Weight of biceps femoris muscle was also lower in Iberian pigs than in LDW pigs (by 18%, expressed as g or g/kg empty body weight, $P < 0.01$, Table 3) and decreased in both genotypes when fed DL diets, (32 to 42% reduction compared to AL pigs, $P < 0.001$). Protein content in biceps femoris was higher in Iberian pigs, and it was reduced in Iberian pigs but not in LDW pigs when fed DL diets (genotype \times diet interaction, $P < 0.01$). Water content and water:protein ratio were higher in the LDW genotype ($P < 0.001$) and increased in both genotypes when fed DL diets ($P < 0.01$). Intramuscular fat (g/kg) was higher in the Iberian muscles ($P < 0.001$), and increased in both pig types when fed DL diets (16 to 26%; $P < 0.01$). Feeding DL diets decreased muscle ash content in both pig types ($P < 0.01$). Energy content (MJ/kg) was higher in Iberian pigs ($P < 0.001$) and was not modified by dietary treatments ($P > 0.05$).

Free L-carnitine concentration in both muscles was increased in pigs fed DL diets (14 to 35%; $P < 0.05$ - 0.01 ; Table 3). On the other hand, in both type of muscles, free L-carnitine concentration was higher in Iberian than in LDW pigs ($P < 0.01$).

The proportion of oxidative muscle fibers in longissimus dorsi was considerably higher in Iberian pigs ($P < 0.001$) and increased in both genotypes when fed DL diets (by 18 to 30%; $P < 0.001$; Table 3).

Table 3

Effects of genotype and dietary lysine content on muscle composition of piglets growing from 10 to 25 kg BW (wet basis)¹

Item	IB		LDW		SEM	P-value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
Longissimus dorsi								
Weight, g	401	299	505	328	28	**	**	NS
Weight, g/kg EBW ³	16.4	13.4	20.1	16.2	1.0	**	**	NS
Protein, g/kg	204 ^c	158 ^a	180 ^b	157 ^a	1	*	***	*
Water, g/kg	748	763	783	797	6	***	*	NS
Water/protein ratio	3.66	4.96	4.36	5.15	0.25	0.087	***	NS
Intramuscular fat, g/kg	35.5 ^a	64.3 ^b	24.7 ^a	32.7 ^a	4.0	***	***	*
Ash, g/kg	12.9	15.2	12.7	12.7	1.0	NS	NS	NS
GE, MJ/kg	5.97	6.13	5.10	4.89	0.19	***	NS	NS
Free L-carnitine, mM	0.874	1.021	0.613	0.805	0.080	**	*	NS
Oxidative fibers, %	41.7	49.6	28.3	36.7	1.7	***	***	NS
Biceps femoris								
Weight, g	252	170	305	176	13	*	***	NS
Weight, g/kg EBW ³	10.3	7.6	12.6	8.7	0.5	**	***	NS
Protein, g/kg	193 ^c	170 ^b	168 ^{ab}	161 ^a	3	***	***	*
Water, g/kg	759	778	793	797	3	***	**	0.053
Water/protein ratio	3.93	4.58	4.76	4.96	0.11	***	**	0.059
Intramuscular fat, g/kg	33.4	39.0	23.6	29.7	2.0	***	**	NS
Ash, g/kg	14.7	12.8	15.8	12.8	0.6	NS	***	NS
GE, MJ/kg	5.63	5.36	4.81	4.83	0.10	***	NS	NS
Free L-carnitine, mM	1.06	1.20	0.685	0.927	0.053	***	***	NS

^{a-c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Initial BW 10.3 ± 0.3 kg and 10.4 ± 0.3 kg for Iberian and Landrace pigs; $n = 7$ individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian; LDW = Landrace × Large White; ¹AL = adequate in lysine (adequate in AA and rest of dietary nutrients [10.9 g Lys/kg diet]); DL = deficient in lysine (was of identical composition except for the Lys content [5.20 g Lys/kg]).

²Gen = genotype; NS = not significant.

³EBW = empty body weight.

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

Intramuscular fat Fatty Acid Composition

The results concerning the effects of genotype and dietary Lys supply on fatty acid composition of IMF of longissimus dorsi and biceps femoris muscles are shown in Table 4. No significant genotype \times diet interaction were detected ($P > 0.05$). In longissimus dorsi, Iberian pigs showed greater C18:1 n-9 and total MUFA ($P < 0.01$), and lower C17:0, C18:2 n-6, C18:3 n-3, linoleic and linolenic acid derivatives, and total PUFA than LDW pigs ($P < 0.001$ in all cases). Total SFA did not differ among both pig types ($P > 0.05$). In all pigs fed DL diets C18:1 n-9 increased ($P < 0.01$), and linoleic and linolenic acids and their derivatives and total PUFA decreased compared to pigs fed AL diets ($P < 0.01$). Total SFA tended to be higher in pigs fed DL diets ($P = 0.079$). Neither genotype nor dietary Lys content influenced $\omega 6/\omega 3$ fatty acids ratio.

Similar results were observed for biceps femoris muscle. Iberian showed greater C14:0, C18:1 n-9 and total MUFA ($P < 0.01$) and lower C17:0, C18:2 n-6 and C18:3 n-3; their derivatives; and total PUFA than LDW pigs ($P < 0.01$). Total SFA and $\omega 6/\omega 3$ fatty acids ratio were not different between genotypes ($P > 0.05$). Oleic acid and C20:1 n-9 increased ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively), whereas linoleic and linolenic acids, C18:3 n-6, C20:5 n-3 and total PUFA decreased in pigs of both genotypes fed DL diet compared with their counterparts fed AL diets ($P < 0.01$). Pigs receiving DL diet presented higher $\omega 6/\omega 3$ fatty acids ratio ($P < 0.01$).

Table 4

Effects of genotype and dietary lysine content on the FA composition (g FA/100 g of identified FA methyl esters) of muscles of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	IB		LDW		SEM	P-value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
Longissimus dorsi								
C14:0	1.42	1.42	1.30	1.26	0.04	NS	NS	NS
C16:0	26.0	26.8	24.8	26.5	0.6	NS	NS	NS
C16:1	4.62	4.81	4.75	3.68	0.34	NS	NS	0.074
C17:0	0.355	0.323	0.558	0.494	0.044	***	NS	NS
C18:0	11.0	10.9	10.5	11.7	0.6	NS	NS	NS
C18:1 n-9	39.4	42.2	37.3	39.0	0.8	**	**	NS
C18:1 n-7	4.66	4.86	4.77	4.10	0.21	NS	NS	0.053
C18:2 n-6	8.0	5.3	10.3	8.3	0.4	***	***	NS
C18:3 n-6	0.080	0.037	0.117	0.076	0.006	***	***	NS
C20:1 n-9	0.567	0.744	0.559	0.743	0.032	NS	***	NS
C18:3 n-3	0.201	0.143	0.240	0.210	0.010	***	***	NS
C20:3 n-6	0.247	0.167	0.319	0.274	0.018	***	**	NS
C20:4 n-6	1.73	0.98	2.45	1.87	0.16	***	***	NS
C20:5 n-3	0.157	0.076	0.240	0.165	0.013	***	***	NS
C22:6 n-3	0.045	0.018	0.102	0.056	0.006	***	***	NS
Total SFA	39.2	39.9	37.6	40.4	0.9	NS	0.079	NS
Total MUFA	49.5	52.8	47.6	47.7	1.2	**	NS	NS
Total PUFA	11.3	7.3	14.8	11.9	0.7	***	***	NS
w6/w3	4.74	4.91	4.55	4.80	0.21	NS	NS	NS
Biceps femoris								
C14:0	1.21	1.22	1.13	1.03	0.04	**	NS	NS
C16:0	24.5	25.3	24.0	24.8	0.5	NS	NS	NS
C16:1	4.38	4.43	4.19	3.49	0.33	0.096	NS	NS
C17:0	0.451	0.418	0.669	0.567	0.061	**	NS	NS
C18:0	10.6	10.1	10.1	10.4	0.3	NS	NS	NS
C18:1 n-9	39.0	41.2	35.5	37.7	0.9	***	*	NS
C18:1 n-7	4.76	4.88	4.62	4.33	0.20	0.091	NS	NS
C18:2 n-6	9.9	7.6	13.4	11.1	0.6	***	***	NS
C18:3 n-6	0.095	0.067	0.143	0.098	0.006	***	***	NS
C20:1 n-9	0.535	0.668	0.538	0.692	0.029	NS	***	NS
C18:3 n-3	0.232	0.176	0.306	0.251	0.011	***	***	NS
C20:3 n-6	0.318	0.269	0.373	0.375	0.023	**	NS	NS
C20:4 n-6	2.32	2.11	3.06	3.09	0.25	**	NS	NS
C20:5 n-3	0.238	0.163	0.285	0.240	0.025	*	*	NS
C22:6 n-3	0.048	0.033	0.064	0.072	0.008	**	NS	NS
Total SFA	37.1	37.4	36.4	37.2	0.8	NS	NS	NS
Total MUFA	48.9	51.4	45.1	46.5	1.3	**	NS	NS
Total PUFA	14.0	11.2	18.5	16.3	0.9	***	*	NS
w6/w3	5.05	5.95	5.33	5.65	0.18	NS	**	NS

¹Initial BW 10.3 ± 0.3 kg and 10.4 ± 0.3 kg for Iberian and Landrace pigs; n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian; LDW = Landrace × Large White; ¹AL = adequate in lysine (adequate in AA and rest of dietary nutrients [10.9 g Lys/kg diet]); DL = deficient in lysine (was of identical composition except for the Lys content [5.20 g Lys/kg]).

²Gen = genotype; NS = not significant. * P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001.

Plasma Metabolites and Hormones

The effects of genotype and dietary Lys concentration on plasma metabolites and hormones are shown in table 5. Plasma creatinine was greater in LDW compared with Iberian pigs (by 17%; $P < 0.005$). No genotype differences were detected for glucose, urea and total cholesterol ($P > 0.05$). Urea and total cholesterol increased in pigs consuming DL diets, by 62 and 26%, respectively ($P < 0.001$). A trend for a decrease in plasma glucose in pigs fed DL diets was observed ($P = 0.051$). A significant genotype \times diet interaction ($P < 0.001$) was detected for plasma triglycerides. This parameter increased in Iberian pigs fed DL diets whereas in LDW fed DL diets, it was not modified. Plasma free L-carnitine concentration was higher in Iberian than in LDW pigs ($p < 0.05$; Table 5). No changes in plasma L-carnitine status due to dietary Lys supply were detected.

Genotype did not significantly influence plasma insulin levels ($P > 0.05$, Table 5), although insulin concentration decreased (35%; $P < 0.05$) in all pigs fed DL diets. Concentration of IGF-1 was higher in Iberian compared with LDW pigs ($P < 0.001$), and decreased in pigs fed DL diets (by 35%, on average, $P < 0.001$). Active ghrelin was higher in LDW pigs (60%; $P < 0.01$) and was not modified by Lys deficiency ($P > 0.05$). Total ghrelin was not significantly affected by genotype or dietary Lys ($P > 0.05$). There was a significant genotype \times diet interaction for plasma leptin concentration ($P < 0.001$). Leptin concentration was 50% greater in Iberian compared with LDW pigs and doubled its concentration in DL fed Iberian pigs, whereas in DL fed LDW pigs no significant alterations were detected.

Table 5Effects of genotype and dietary lysine content on plasma metabolite and hormone concentration of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

	IB		LDW		SEM	P-value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
Biochemical parameters, mg/dL								
Glucose	124	92	143	107	18	NS	0.051	NS
Urea	28.4	41.2	21.9	40.4	2.6	NS	***	NS
Creatinine	1.06	1.04	1.23	1.23	0.10	**	NS	NS
Total cholesterol	95.6	125	101	123	7.1	NS	***	NS
Triglycerides	28.1 ^a	52.6 ^c	42.0 ^b	30.0 ^{ab}	4.3	NS	NS	***
Free L-carnitine, μM	17.3	16.1	9.3	13.9	1.9	*	NS	NS
Hormone concentrations								
Insulin, μU/mL	12.5	8.1	15.8	8.3	2.6	NS	*	NS
IGF-1, ng/mL	295	199	192	122	14	***	***	NS
Leptin, ng/mL	3.82 ^b	7.68 ^c	1.92 ^a	2.73 ^{ab}	0.41	***	***	***
Acylated ghrelin, pg/mL	35.9	35.3	57.7	43.5	4.9	**	NS	NS
Total ghrelin, pg/mL	386	433	401	324	33	NS	NS	0.070

^{a-c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).¹Initial BW 10.3 ± 0.3 kg and 10.4 ± 0.3 kg for Iberian and Landrace pigs; n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian; LDW = Landrace × Large White; ¹AL = adequate in lysine (adequate in AA and rest of dietary nutrients [10.9 g Lys/kg diet]); DL = deficient in lysine (was of identical composition except for the Lys content [5.20 g Lys/kg]).²Gen = genotype; NS = not significant. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

Iberian pig is an autochthonous, slow-growing, fatty-type pig breed, located in the southwest of Spain, known for the quality of their products, particularly the dry-cured, which achieve relatively high market prices. In previous work, we have shown that they have lower potential for lean growth compared with conventional pig breeds (Nieto et al., 2012). Currently, this native breed accounts for 10 % of total pigs produced in Spain (MAGRAMA, 2016). Previous studies from our lab indicated that effects on growth and body protein retention of Lys-deficient diets were less pronounced in Iberian gilts than in Landrace gilts of similar BW and reared under similar conditions (Rivera-Ferre et al., 2006). The purpose of this study was to explore further differences in breed responses to Lys-deficient diets, particularly on muscle biochemical composition and metabolic parameters. Lysine-deficient diets have been recognized as an effective nutritional approach to increase IMF deposition in conventional pigs (Katsumata, 2011), a trait generally linked to meat tenderness and juiciness (Wood et al., 2008). However, increased IMF linked to reduced Lys intake has

been shown in lean but not in fatty pigs similar to the ones used in this study (Madeira et al., 2013).

One difficulty concerns their unequal capacities for food intake if comparisons are made under similar nutrient intake conditions. The moderate reduction of feed intake performed on Iberian piglets was effective in achieve similar nutrient intake between genotypes. Nevertheless, LDW pigs consuming DL diets had lower feed intake than LDW pigs fed the AL treatment, whereas in Iberian pigs, feed intake was not affected by Lys deficiency, confirming previous observations (Rivera-Ferre et al., 2005, 2006). Deficiencies in essential AA can lead to food intake depression (Gietzen et al. 2007) and the breed differences observed could be linked to differences in feed intake regulation related to genotype.

As expected, growth rate and feed efficiency were higher in the leaner breed (Rivera-Ferre et al., 2006; Barea et al., 2011). The higher backfat depth of Iberian piglets indicates the predisposition to deposit fat of this breed even at this early growth stage. The effects of Lys deficiency on growth and performance were comparatively greater in LDW pigs, in agreement with previous observations in Iberian and Landrace gilts fed adequate and Lys-deficient diets (Rivera-Ferre et al., 2006). Conventional pigs might be more likely to experience decrease performance in less favorable production conditions than nonselected pigs; in this sense, it has been suggested that highly selected pigs are more sensitive to nutritional deficiencies than animals of lower protein deposition potential (van Lunen and Cole, 1996).

Weights of longissimus dorsi and biceps femoris were higher in the leaner breed, both in absolute and relative (g/kg empty body weight) terms, in agreement with previous observations (Rivera-Ferre et al., 2005). Muscle protein concentration was higher in Iberian than in LDW pigs when both were fed AL diets, although the proportion of lean tissue (protein + water) in the 2 muscles studied was greater in LDW pigs (958 and 959 for the LDW pigs in longissimus dorsi and biceps femoris, respectively, and 936 and 950 g/kg for the Iberian pigs in longissimus dorsi and biceps femoris, respectively; $P < 0.001$), indicative of the greater potential for lean growth of LDW pigs at this stage.

A positive relationship between the acceptability or the tenderness of pork and IMF content is generally accepted (Font-i-Furnols et al., 2012). Similarly to other traditional Mediterranean pig breeds, relatively high IMF contents are found in muscles from Iberian pigs (López-Bote, 1998; Lebret, 2008; Pugliese and Sirtori, 2012).

In the present work, the IMF content of longissimus dorsi and biceps femoris was higher in Iberian pigs. Bressan et al. (2016), comparing finishing Iberian and F₁ Large White × Landrace pigs reared under similar conditions, found that the IMF content in longissimus thoracis muscle at slaughter (160 kg) was highly dependent on genotype (10.74 vs 3.04% in Iberian and the lean breed, respectively) with no effect of the rearing system (intensively vs oak and pasture outdoors). We have also observed higher IMF content in longissimus dorsi and biceps femoris muscles of Iberian compared with LDW pigs slaughtered at 50 and 115 kg BW, reared under similar conditions (Palma-Granados et al., unpublished data).

In the present work, IMF content increased in longissimus dorsi and biceps femoris of pigs of both genotypes fed DL diets (although in longissimus dorsi of LDW pigs, the numerical increase did not reach statistical significance). These observations partially agree with previous findings reporting that a decrease in dietary Lys - maintaining the same CP content- lead to a significant increase in IMF in longissimus dorsi of finishing gilts (Katsumata et al., 2005). An increase in IMF has been also reported by other authors when decreasing dietary Lys while CP was maintained constant (Tous et al., 2014). The effect on IMF seems to be related to dietary Lys shortage. Kobayashi et al. (2012) found that decreasing other essential AA as threonine had no significant effect on IMF concentration. On the other hand, Rodríguez-Sánchez et al. (2011) found no significant effect on IMF of longissimus thoracis muscle when Lys concentration decreased from 7 to 6 g/kg in finishing barrows and gilts. Madeira et al. (2013) also found that IMF of longissimus lumborum muscle was promoted in crossbred lean pigs fed reduced CP Lys-deficient diets (13.1% CP and 0.40% Lys); however, no IMF increase was obtained if the reduced CP content diet was adjusted for Lys (13.2% CP and 0.56% Lys). In contrast to our results, they did not find any effect of the same dietary treatments in IMF of longissimus lumborum of Alentejano pigs, a fatty pig type very close to the Iberian. In our opinion, in this latter case, the dietary treatments, which were the same for both lean and fatty pigs, possibly provided an oversupply of protein to the Alentejano pigs (which probably were not, therefore, under Lys-deficient conditions), according to previous observations in Iberian pigs of the same BW range (50-100 kg BW; Barea et al. 2006, 2007). In this sense, Iberian pigs are often reared in extensive conditions during the last phase of growth, consuming only acorn and pasture. Acorn has a low amount of protein with a marked Lys deficiency (Niето et al., 2002; García-Valverde et al., 2010). This nutritional regime probably limits lean tissue deposition (less lean tissue in

premium cuts) but on the other hand, it may enhance IMF deposition. For Iberian pigs finalized in intensive conditions, this nutritional strategy could also be used to obtain higher IMF contents in meat. Further research in this area will be necessary to clarify these aspects.

Wood et al. (2008) reported that fatty acid proportions change as fat content of tissues increases. According to these authors, as pig grow, the proportion of C18:1 n-9 increases and that of C18:2 n-6 decreases, which is linked to the increasing role of lipogenesis of MUFA and a relative decline of direct incorporation of essential fatty acids from the diet. In agreement with these observations, we found an increase in C18:1 n-9 and a decrease in C18:2 n-6, C18:3 n-3 and total PUFA (g/100 g of total fatty acids) in IMF of longissimus dorsi and biceps femoris of pigs of both genotypes fed Lys-deficient diets. Our observations are in line with those of Katsumata et al. (2005) in longissimus dorsi of finishing gilts fed lysine-deficient diets. Madeira et al. (2013) also found an increase in C18:1 n-9 (mg/100 g muscle) in longissimus lumborum of lean pigs fed a reduced CP diet not adjusted for Lys compared with control pigs, although no effect was detected in fatty pigs. Tous et al. (2014) found an increase of MUFA and a decrease of PUFA in IMF of longissimus lumborum of pigs fed reduced CP diets but no effect on IMF fatty acid composition on pigs fed Lys-deficient diets. Differences in IMF deposition and fatty acid composition among studies could be related to the degree of Lys deficiency assayed and the BW range of pigs. Daza et al. (2012) described a positive relationship between the proportion of C18:1 n-9 and IMF in longissimus thoracis muscle of heavy crossbred gilts, which is in line with our observations and those of the abovementioned studies. In this sense, according to Ntawubizi et al (2009), the increased MUFA and decreased PUFA proportions as IMF content is increased could be partially related to the unequal distribution of fatty acids among triacylglycerols and phospholipids and the increasing proportion in triacylglycerols as IMF is elevated.

Although the mechanism involved in the accumulation of IMF when feeding Lys-deficient diets is not fully understood, one of the possibilities is enhanced lipid synthesis. Katsumata et al. (2005) found increased mRNA abundance of PPAR- γ (nuclear hormone receptor involved in adipocyte gene expression and differentiation) and leptin (synthesized and secreted by adipocytes) in longissimus dorsi of Lys deficient pigs, indicative of higher adipogenesis in muscle. Additionally, increased proportions of C18:1 n-9 and lower proportions of PUFA in IMF of pigs fed Lys-

deficient diets suggest an activation of lipogenic enzymes at muscle level. In this respect, Doran et al. (2006) reported increased stearoyl-CoA desaturase activity and protein expression and increased protein expression of fatty acid synthase, in LM of pigs reared on reduced protein content (and lysine) diets. We have also found increased activity of fatty acid synthase, glucose-6-P dehydrogenase and malic enzyme in muscles of pigs of this study fed Lys-deficient diets (Palma-Granados et al., unpublished).

On the other hand, IMF could be also promoted if lipolytic activity is decreased. Because Lys is a precursor of carnitine, changes in Lys supply may affect carnitine status. Consequently, we hypothesized that a restriction in dietary Lys should lead to a reduced carnitine concentration in muscle of Lys-deficient pigs. Because carnitine is essential for transport of long-chain fatty acids from the cytosol to the mitochondrial matrix to undergo β -oxidation (Vaz and Wanders, 2002), reduced carnitine and, in turn, β -oxidation rate of fatty acids could contribute to explain higher IMF in Lys-deficient pigs. Unexpectedly, free L-carnitine concentration increased in muscles of pigs fed DL, with respect to control animals. Our findings contrast with those of Katsumata et al. (2005), who reported decreased free L-carnitine concentration in longissimus dorsi of finishing gilts fed Lys-reduced diets. We do not have a satisfactory explanation for such discrepancies, although it could be related to the different age (and BW) of pigs between studies. Nevertheless, it would seem that the increase in IMF in Lys-deficient pigs found in the present work would be related to increased lipogenic activity rather than decreased lipolysis.

In addition, we found increased oxidative activity (NADH dehydrogenase, an enzyme of the mitochondrial respiratory chain) in fibers of longissimus dorsi of Iberian and LDW pigs fed the DL diet. Using a similar approach, Katsumata et al. (2008) found and increased proportion of oxidative fibers, as well as citrate synthase activity (another indicator of oxidative metabolism of cells), in longissimus dorsi and rhomboideus muscles of young barrows fed a Lys-deficient diet during 3 wk. These authors also reported a higher abundance of PGC-1 α mRNA (which is a regulator of biogenesis of mitochondria; Puigserver et al., 1998; Wu et al, 1999), in muscles of piglets fed Lys-deficient diets. Recently, Conde-Aguilera et al. (2016) described that the proportion of Type I fibers (predominantly oxidative) and citrate synthase activity increased in longissimus and rhomboideus muscles of piglets fed diets deficient in sulphur AA for 10 d. Effects of nutritional changes on biochemical properties of

muscles were described by Karlsson et al. (1993), which showed higher glycolytic and lower oxidative capacity and IMF content in muscles of pigs fed high-protein diets. Similarly, it seems that in young pigs, the metabolic properties of muscle fibers could be shifted by nutritional factors, such as a single essential AA deficiency.

According to our results, the abundance in oxidative fibers in longissimus dorsi was higher in Iberian than in LDW pigs. Studies on abundance of muscle fiber types in other local breeds (with lower potential for lean growth compared with leaner breeds) showed increased proportions of oxidative fibers (richer in mitochondria and lipids) when compared with conventional pig breeds (Lefaucheur et al., 2004; Wimmers et al., 2008; Guo et al., 2011). Interestingly, in our study, pigs with a higher proportion of oxidative muscle fibers (Iberian vs LDW pigs, and pigs fed DL vs AL diets) showed also increased concentration of free L-carnitine, which could be related to a greater capacity to use lipids as an energy substrate in muscle cells. A relationship between muscle carnitine concentration and muscle oxidative potential in humans has been suggested (Cederblad et al., 1976; Gatti et al., 1998). However, we found higher plasma free L-carnitine levels for Iberian pigs compared with LDW pigs, but no dietary effect was detected.

The effects of pig genotype and Lys deficiency on plasma metabolites and hormones found in the present work are, in general, in line with previous observations of a comparative study with Iberian and Landrace gilts fed either adequate or Lys-deficient diets and reared in similar conditions (Fernández-Fígares et al., 2007). Pigs consuming Lys-deficient diets showed decreased insulin and IGF-1 plasma concentrations, concomitantly with reduced ADG and higher plasma urea concentration (associated with decreased N utilization efficiency; Coma et al., 1995). The general increase in plasma leptin concentration shown in pigs consuming Lys-deficient diets, which was more evident in Iberian pigs, has been also reported by Katsumata et al. (2005) in Lys-deficient finishing gilts, and it presumably could be related to a greater fat deposition with this feeding regime. Ghrelin, a peptide produced mainly in the stomach, could act as an appetite regulatory signal, among other functions (Dong et al., 2009). Two active forms of ghrelin have been described, acylated and des-acylated, the former apparently associated with increased feed intake and weight gain and the des-acylated form with opposite effects (Soares and Leite-Moreira, 2008). However, no effects of dietary treatment were observed either in acylated or total ghrelin plasma concentrations in this study.

The present results demonstrate that IMF content and composition can be manipulated by reducing dietary Lys concentration in lean and fatty young pigs. Nevertheless, best time schedule and extension of Lys deficiency treatment need to be further investigated to manipulate IMF levels in finishing pigs by nutritional means with minimum penalty on rates of growth. The BW range and Lys and CP concentrations to apply such treatments would necessary be different for finishing pigs of fatty or lean type. Further research is needed to clarify these aspects.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) grant No. AGL2011-25360. P. Palma-Granados had a fellowship from the Spanish MICINN FPI Program (BES-2012-053078). We thank M.A. Liñán for skillful technical assistance. We are also very grateful to Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. (El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain) for providing Iberian purebred experimental animals. Corn gluten meal and corn starch used in this experiment were kindly provided by Tereos Syral (Zaragoza, Spain). The assays described are part of the doctoral thesis of P. Palma-Granados, under the Doctoral Program of Granada University, Spain.

LITERATURE CITED

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Barea, R., R. Nieto, and J. F. Aguilera. 2007. Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism of Iberian pigs growing from 50 to 100 kg. *Animal*. 1:357-365. doi:10.1017/S1751731107666099
- Barea, R., R. Nieto, L. Lara, M. A. García, M. A. Vílchez, and J. F. Aguilera. 2006. Effects of dietary protein content and feeding level on carcass characteristics and organs weights of Iberian pigs growing between 50 and 100kg live weight. *Animal Sci*. 82:405-413. doi:10.1079/ASC200645
- Barea, R., R. Nieto, F. Vitari, C. Domeneghini, and J. F. Aguilera. 2011. Effects of pig genotype (Iberian vs. Landrace × Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal*. 5:547–557. doi:10.1017/S1751731110002181
- Bressan, M. C., J. Almeida, J. Santos Silva, C. Bettencourt, A. Francisco, and L. T. Gama. 2016. Carcass characteristics and fat depots in Iberian and F Large White × Landrace pigs

- intensively finished or raised outdoors in oak-tree forests. *J. Anim. Sci.* 94:2592-2602. doi:10.2527/jas.2016-0276
- Cederblad, G., A. C. Bylund, J. Holmand, and T. Scherstén, 1976. Carnitine concentration in relation to enzyme activities and substrate utilization in human skeletal muscles. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36:547-552. doi:10.3109/00365517609054477
- Coma, J., D. Carrion, and D. R. Zimmerman. 1995. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs. *J. Anim. Sci.* 73:472-481. doi:10.2527/1995.732472x
- Conde-Aguilera, J. A., M. A. Aguinaga, J. F. Aguilera, and R. Nieto. 2011. Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with different protein concentrations. *J. Anim. Sci.* 89:754–763. doi:10.2527/jas.2010-3173
- Conde-Aguilera, J. A., L. Lefaucheur, S. Tesseraud, Y. Mercier, N. Le Floc’h, and J. van Milgen. 2016. Skeletal muscles respond differently when piglets are offered a diet 30% deficient in total sulfur amino acid for 10 days. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55:117-126. doi:10.1007/s00394-014-0830-9
- Daza, A., M. A. Latorre, and J. C. López-Bote. 2012. The effect of granulated barley as single major ingredient in the growing or finishing diet on productive performance, carcass, meat and fat quality of heavy pigs. *Animal* 6:1543-1553. doi:10.1017/S1751731112000110
- de Blas, C., G. G. Mateos, and P. García Rebollar, editors. 2010. *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. 3rd ed. (In Spanish.) Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, Spain.
- Dong, X. Y., J. Xu, S. Q. Tang, H. Y. Li, Q. Y. Jiang, and X. T. Zou. 2009. Ghrelin and its biological effects on pigs. *Peptides* 30: 1203-1211. doi:10.1016/j.peptides.2009.03.001
- Doran, O., S. K. Moulle, G.A. Teye, F. M. Whittington, K. G. Hallet, and J. D. Wood. 2006. A reduced protein diet induces stearyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *Br. J. Nutr.* 95: 609-617. doi:10.1079/BJN20051526
- Fernández-Figares, I., M. Lachica, R. Nieto, M. G. Rivera-Ferre, and J. F. Aguilera. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livest. Sci.* 110:73-81. doi:10.1016/j.livsci.2006.10.002
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Font-i-Furnols, M., N. Tous, E. Esteve-Garcia, and M. Gispert. 2012. Do all the consumers accept marbling in the same way? The relationship between eating and visual acceptability of

- pork with different intramuscular fat content. *Meat Sci.* 91:448-453. doi:10.1016/j.meatsci.2012.02.030
- García-Valverde, R., R. Nieto, and J. F. Aguilera. 2010. Effects of herbage ingestion upon ileal digestibility of amino acids in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94:203-214. doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01008.x
- Gatti, R., C. B. De Palo, P. Spinella, and E. F. De Palo. 1998. Free carnitine and acetyl carnitine plasma levels and their relationship with body muscular mass in athletes. *Amino acids.* 14:361-369. doi:10.1007/BF01318855
- Gietzen, D. W., S. Hao, and T. G. Anthony. 2007. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 27:63-78. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093726
- Guo, X., R. Tang, W. Wang, D. Liu, and K. Wang. 2011. Effects of dietary protein/carbohydrate ratio on fat deposition and gene expression of peroxisome proliferator activated receptor γ and heart fatty acid-binding protein of finishing pigs. *Livest. Sci.* 140:111-116. doi:10.1016/j.livsci.2011.02.016
- Karlsson, A., A. C. Enfält, B. Essén-Gustavsson, K. Lundström, L. Rydhmer, and S. Stern. 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.
- Katsumata, M. 2011. Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. *Anim. Sci. J.* 82:17-25. doi:10.1111/j.1740-0929.2010.0084.x
- Katsumata, M., S. I. Kobayashi, M. Matsumoto, E. Tsuneishi, and Y. Kaji. 2005. Reduced intake of dietary lysine promotes accumulation of intramuscular fat in the Longissimus dorsi muscles of finishing gilts. *Anim. Sci. J.* 76:237-244. doi:10.1111/j.1740-0929.2005.00261.x
- Katsumata, M., M. Matsumoto, S. I. Kobayashi, and Y. Kaji. 2008. Reduced dietary lysine enhances proportion of oxidative fibers in porcine skeletal muscle. *Anim. Sci. J.* 79:347-353. doi:10.1111/j.1740-0929.2008.00536.x
- Kobayashi, H., A. Ishida, A. Ashihara, K. Nakashima, and M. Katsumata. 2012. Effects of dietary low level of threonine and lysine on the accumulation of intramuscular fat in porcine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76:2347-2350. doi:10.1271/bbb.120589
- Kramer, J. K. G., and J. Zhou. 2001. Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 103:594-600. doi:10.1002/1438-9312(200109)103:9<594::AID-EJLT5942>3.0.CO;2-R
- Lebret, B. 2008. Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal.* 2:1548-1558.

- Lefaucheur, L., D. Milan, P. Ecolan, and C. Le Callennec. 2004. Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs. *J. Anim. Sci.* 82:1931-1941. doi:10.2527/2004.8271931x
- Lopez-Bote, C. J. 1998. Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Sci.* 49:17-27. doi:10.1016/S0309-1740(98)00072-2
- Madeira, M. S., P. Costa, C.M. Alfaia, P. A. Lopes, R. J. B. Bessa, J. P. C. Lemos, and J. A. Prates. 2013. The increased intramuscular fat promoted by dietary lysine restriction in lean but not in fatty pig genotypes improves pork sensory attributes. *J. Anim. Sci.* 91: 3177-3187. doi:10.2527/jas.2012-5424
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2016. Producción y mercados ganaderos. Porcino. (In Spanish.) <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/default.aspx>. (Accessed 15 November 2016.)
- Morales, J., J. F. Pérez, M. D. Baucells, J. Mourot, and J. Gasa. 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn and corn-sorghum-acorn based diets. *Livest. Prod. Sci.* 77:195-205. 10.1016/S0301-6226(02)00063-5
- Nieto, R., L. Lara, R. Barea, R. García-Valverde, J. A. Conde-Aguilera, and J. F. Aguilera 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *J. Anim. Sci.* 90:3809-3820. doi:10.2527/jas.2011-5027
- Nieto, R., M. Martínez-Pérez, A. Haro, L. Lara, and J. F. Aguilera. 2015. Effects of protein intake on rate of growth, protein deposition, and carcass traits of heavy Iberian pigs. *J. Anim. Sci.* 93:3471-3482. doi:10.2527/jas.2014-8822
- Nieto, R., A. Miranda, M. A. García, and J. F. Aguilera. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *Br. J. Nutr.* 88:39-49. doi:10.1079/BJN2002591
- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ntawubizi, M., K. Raes, N. Buys, and S. De Smet. 2009. Effect of sire and sex on the intramuscular fatty acid profile and indices for enzyme activities in pigs. *Livestock Sci.* 122:264-270. doi:10.1016/j.livsci.2008.09.008
- Pugliese, C., and F. Sirtori. 2012. Quality of meat and meat products produced from southern European pig breeds. *Meat Sci.* 90:511-518. doi:10.1016/j.meatsci.2011.09.019
- Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92:829-839. doi:10.1016/S0092-8674(00)81410-5

- Rivera-Ferre, M. G., J. F. Aguilera, and R. Nieto. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Nutr.* 135:469-478.
- Rivera-Ferre, M. G., J. F. Aguilera, and R. Nieto. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Anim. Sci.* 84:3346–3355. doi:10.2527/jas.2005-405
- Rodríguez-Sánchez, J. A., M. A. Sanz, M. Blanco, M. P. Serrano, M. Joy, and M. A. Latorre. 2011. The influence of dietary lysine restriction during the finishing period on growth performance and carcass, meat, and fat characteristics of barrows and gilts intended for dry-cured ham production. *J. Anim. Sci.* 89:3651-3662. doi:10.2527/jas.2010-3791
- Sheehan, D. C., and B. B. Hrapchak. 1987. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd ed. Battelle Press, Columbus, OH.
- Soares, J. B., and A. F. Leite-Moreira. 2008. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29: 1255-1270. 10.1016/j.peptides.2008.02.018
- Tous, N., R. Lizardo, B. Vila, M. Gispert, M. Font-i-Furnols, and E. Esteve-Garcia. 2014. Effect of reducing dietary protein and lysine on growth performance, carcass characteristics, intramuscular fat, and fatty acid profile of finishing barrows. *J. Anim. Sci.* 92:129-140. doi:10.2527/jas.2012-6222
- van Lunen, T. A., and D. J. A. Cole. 1996. Energy-amino acid interactions in modern pig genotypes. In: P.C. Garnsworthy, J. Wiseman and W. Haresign, editors, *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. p. 233-261.
- Vaz, F. M., and R. J. Wanders. 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 361:417-429. doi:10.1042/bj3610417
- Whittemore, C. T., M. J. Hazzledine, and W. H. Close. 2003. *Nutrient requirement standards for pigs*. British Society of Animal Science, Penicuik, UK.
- Wimmers, K., N. T. Ngu, D. G. J. Jennen, D. Tesfaye, E. Murani, K. Schellander, and S. Ponsuksili. 2008. Relationship between myosin heavy chain isoform expression and muscling in several diverse pig breeds. *J. Anim. Sci.* 86:795-803. doi:10.2527/jas.2006-521
- Wood, J. D., M. Enser, A. V. Fisher, G. R. Nute, P. R. Sheard, R. I. Richardson, S. I. Hughes, and F. M. Whittington. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78:343-358. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.019
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98:115-124. doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-X

Effects of lysine deficiency on carcass composition and activity and gene expression of lipogenic enzymes in muscles and backfat adipose tissue of fatty and lean piglets

Patricia Palma-Granados¹, Isabel Seiquer¹, Rita Benítez², Cristina Óvilo² and Rosa Nieto¹

¹*Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain*

²*Department of Animal Genetics, INIA, Ctra. Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain*

En evaluación

ABSTRACT

The effects of feeding lysine deficient diets on carcass traits and lipogenic enzyme activity and gene expression in muscle and backfat adipose tissue were investigated in fatty (Iberian) and conventional pigs (Landrace × Large White, **LDW**) under identical experimental conditions. Twenty-eight barrows of 10 kg initial BW, 14 per breed, were fed two isoproteic (200 g CP /kg DM) and isocaloric (14.7 MJ ME/kg DM) diets with identical composition except for the lysine content (1.09% for diet adequate in lysine and 0.52% for diet deficient in lysine). At 25 kg BW pigs were slaughtered by exsanguination after electrical stunning. On pigs of both genotypes fed the lysine deficient diet, carcass protein concentration and the relative proportions of the leaner component of carcass (loin, ham and shoulder; $P < 0.01$) decreased and carcass lipid concentration, and most of the fatty components of the carcass were elevated compared to pigs fed lysine adequate diet ($P < 0.001$). In most cases, the activity and gene expression of lipogenic enzymes (fatty acid synthase (**FAS**), malic enzyme (**ME**), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (**G6PDH**) in tissues were greater in Iberian than in LDW pigs. When pigs consumed the lysine deficient diet, the activity and gene expression of lipogenic enzymes in backfat adipose tissue decreased or was unchanged, whereas in *longissimus dorsi* muscle, the activity of FAS, G6PDH and ME increased ($P < 0.01$) in both genotypes, added to an upregulation of gene expression in the case of Iberian pigs ($P < 0.05$ to $P < 0.001$). In *biceps femoris* muscle of lysine deficient pigs the activity of FAS and ME enzymes increased and *ME1* was upregulated (added to *FASN* in the case of Iberian pigs; $P < 0.01$ to $P < 0.001$). The results show that in both fatty and lean piglets, the lipogenic effect of lysine deficiency seems to be tissue specific, promoting an activation of the lipogenic enzyme systems of *longissimus dorsi* and *biceps femoris* muscle with no apparent stimulation of lipogenesis in backfat adipose tissue. Suitable feeding protocols including lysine-deficient diets should be designed for each pig type to increase intramuscular lipids avoiding penalizing growth of lean carcass components.

Keywords: lipogenic enzymes, muscle, pig genotype, lysine deficiency, carcass composition

IMPLICATIONS

In fatty and lean pigs specific nutritional strategies involving dietary lysine restriction can be further developed and applied to increase intramuscular fat in the fattening period with positive consequences on meat quality and minimum penalty of lean carcass growth.

INTRODUCTION

An important factor affecting meat organoleptic characteristics is the amount and composition of intramuscular fat (**IMF**) (Wood *et al.*, 2008), and a positive relationship between the acceptability or the tenderness of pork and IMF content is generally accepted (Font-i-Furnols *et al.*, 2012). Different nutritional strategies have been proposed to increase IMF in pigs, as reducing dietary crude protein levels (Doran *et al.*, 2006) or reducing dietary lysine (Katsumata *et al.*, 2005; 2011). Recently, we have shown that reduced lysine supply -maintaining constant crude protein levels- could be an effective strategy to increase IMF in fatty (Iberian) and conventional pigs (Palma-Granados *et al.*, 2017a). Changes in other biochemical parameters such as increased oleic acid concentration of IMF, and increased proportion of oxidative muscle fibers in pigs fed a lysine deficient diet were also observed. In contrast, other authors have reported that reduced lysine supply was effective in increasing IMF content in *longissimus lumborum* muscle of lean pigs but not in fatty Alentejano pigs (Madeira *et al.*, 2013).

Reduction of dietary lysine could have a negative impact on growth and protein deposition; therefore, further research is needed to design best strategies to modulate IMF content according to different factors, as pig body weight or genotype, in order to obtain desirable effects on IMF content and composition with minimum penalty on pig growth. Apart from IMF effects, it is also of interest to elucidate possible effects of lysine deficiency on growth and development of other fat depots, in this sense, Katsumata *et al.* (2005) did not detect any significant influence of lysine deficiency on backfat-adipose tissue depth, carcass weight, and *longissimus dorsi* (*I. dorsi*) area of (Landrace × Large White) × Duroc finishing gilts. Similarly, Tous *et al.* (2014) found no effect of dietary lysine deficiency on backfat proportions or backfat thickness of Landrace × Duroc finishing barrows. In contrast, we have found increased

back fat depth at the fist rib, and lower carcass length in young Iberian and conventional pigs fed a lysine deficient diet (Palma-Granados *et al.*, 2017a).

The mechanisms involved in the promotion of IMF by a lysine deficient supply are not fully understood, although increased mRNA abundance of PPAR- γ (nuclear hormone receptor involved in adipocyte gene expression and differentiation) in *I. dorsi* has been reported (Katsumata *et al.*, 2005). Doran *et al.* (2006) described increased activity and protein expression of stearoyl-CoA desaturase (**SCD**, involved in MUFA biosynthesis) in muscle but not in subcutaneous adipose tissue of pigs fed low protein diet. Additionally, Madeira *et al.* (2013) have reported that lysine deficiency increased mRNA levels for SCD in muscle but not in backfat adipose tissue of lean pigs, although the muscle effect was not observed in fatty pigs (Alentejano).

With this background, the aim of the present study was to further investigate the effects of a deficient lysine supply on carcass composition, and lipogenic enzyme activity and gene expression in *I. dorsi*, *biceps femoris* (**b. femoris**) and backfat subcutaneous adipose tissue of fatty (Iberian) and conventional pigs (Landrace \times Large White (**LDW**)) pigs. We hypothesized differential effects of lysine deficiency on lipogenic enzymes activity and gene expression among tissues and similar general effects between breeds.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures and animal care were performed according to Spanish Ministry of Agriculture guidelines (RD53/2013). Procedures used in this experiment were approved by the Bioethical Committee of Spanish National Research Council (CSIC, Spain) and the competent local authority (Junta de Andalucía, Spain).

Animals, diets and experimental design

Animals, diets and experimental design have been described previously (Palma-Granados *et al.*, 2017a). Briefly, 14 purebred Iberian and 14 LDW barrows from a commercial lean cross were selected at random from 8 and 7 litters of the same age (58 and 50 days, respectively). Pigs were housed in individual pens of 2 m² at 10 kg BW and they were randomly assigned to each of two experimental diets (n=7 pigs per diet and breed). Diets were isonitrogenous and isoenergetic containing (per kg DM) 200 g CP and 14 MJ ME. One of the diets was adequate in AA and rest of dietary

nutrients (**AL**, 10.9 g lysine/kg DM), the other was of identical composition except for the lysine content (**DL**, 5.20 g lysine/kg DM). Composition of experimental diets has been published elsewhere (see Palma-Granados *et al.*, 2017a, Table 1). Daily feed allowance was adjusted on a weekly basis according to a BW function (Conde-Aguilera *et al.*, 2011) and pigs were fed at $0.85 \times ad\ libitum$ intake of the Iberian genotype, of greater intake capacity (Morales *et al.*, 2002). Feed refusals were collected daily, dried and weighed. Water was freely available. Pigs were slaughtered by exsanguination after electrical stunning at 25 kg BW. The empty gut, carcass and organs were weighed separately. The carcass without head, feet and tail was weighed and divided longitudinally. Samples of backfat, *l. dorsi* and *b. femoris* were immediately collected from the left half of carcass, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The right half of carcass was rapidly processed as described in Nieto *et al.* (2015) to obtain carcass components, and all components together were cut into small pieces, ground in a mincer (Talleres Cato, Sabadell, Spain), homogenized in a cutter (Talleres Cato, Sabadell, Spain), and subsamples were taken for freeze-drying and subsequent analysis. The empty BW (EBW) at slaughter was calculated as the sum of hot carcass, blood, and organs and viscera, including the empty gastrointestinal tract.

Carcass chemical composition

All analyses were performed in duplicate. Dry matter, N, gross energy, fat, and fatty acid (**FA**) composition of freeze-dried samples of carcass were performed according to the procedures described in Palma-Granados *et al.* (2017a)

Lipogenic enzyme activity assays

The activities of malic enzyme (**ME**), glucose-6-phosphate dehydrogenase (**G6PDH**), and fatty acid synthase (**FAS**) were assessed in aliquots of backfat subcutaneous adipose tissue and *l. dorsi* and *b. femoris* muscles. The samples were homogenized in an ice-cold 0.3 M sucrose solution containing 1 mM EDTA and 25 mM dithiothreitol, and centrifuged for 20 min at $20\ 000 \times g$ at 4°C . The supernatant, containing the cytosolic fraction, was collected and stored at -80°C . The ME, G6PDH and FAS activities were assayed in the cytosolic fraction according to Bazin and Ferre (2001) by measuring absorbance at 340 nm at 37°C , to assess the appearance (in ME

and G6PDH) or the decrease (in FAS) of NADPH. Substrate quantities were optimized to ensure linearity of the reaction. The soluble protein concentration in supernatant was determined using a commercial kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Ref., 23225-23227, Thermo Scientific). Enzyme activities were expressed as nmol of NADPH per minute per mg of protein.

Lipogenic enzyme gene expression quantification

Total RNA was extracted from 50–100 mg of backfat subcutaneous adipose tissue and *l. dorsi* and *b. femoris* muscles. Samples were homogenized with 1 ml of TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA), using an Ultra-Turrax® homogenizer (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany). The homogenate was incubated for 5 min at room temperature to allow dissociation of nucleoprotein complexes before adding 200 µL of chloroform. The solution was mixed briefly, incubated for 3 min at room temperature, and then centrifuged at 12 000 × g for 15 min at 4°C. The aqueous phase was collected, precipitated with 500 µL of ethanol, then applied to an RNeasy Mini-column (Qiagen, UK) before spinning for 30 s at 10 000 × g. The flow through was discarded and RNA bound to the column was DNase treated using RNase-free DNase Set (Qiagen) and collected in a 50 µL volume. The RNA quantity was measured using a ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington). RNA integrity number was measured using Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, CA) and ranged from 6.8 to 8.6 in backfat adipose tissue and, from 7.0 to 9.6 in muscle. The extracted total RNA was reverse transcribed using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, UK) following the protocol of the manufacturer.

Statistical analysis

Statistical analyses of body and carcass composition, and lipogenic enzyme activity assays were assessed by ANOVA using the GLM procedure of SAS. The effects of genotype (Iberian, LDW), dietary lysine content (AL, DL), and their interactions were included in the statistical model. Piglet was considered the statistical unit. When interaction between main factors was significant, means from each of the four treatment combinations were compared by one-way ANOVA. Results are expressed as least squares means. Statistical significance was assessed by Tukey's t-test. The level of significance was set to 5%.

The statistical analysis of gene expression data was performed following the method proposed by Steibel *et al.* (2009), which consists of the analysis of cycles to threshold values for the target and endogenous genes using a linear mixed model as described in Ayuso *et al.* (2015).

RESULTS

Pigs showed good health and normal behavior during the experiment. Results on animal performance have been published elsewhere (Palma-Granados *et al.*, 2017a). Briefly, growth rate and feed efficiency decreased in pigs fed the DL diet, particularly those of LDW genotype. Carcass length and muscle weights were lower in Iberian than in LDW pigs, and both parameters decreased in all pigs when they consumed the DL diet. In the same paper we reported that IMF content increased in *l. dorsi* and *b. femoris* of pigs of both genotypes fed DL diet (in *l. dorsi* of LDW pigs the numerical increase did not reach statistical significance).

Body and carcass composition

The effects of genotype and dietary lysine content on body and carcass components are displayed in Table 1. Lysine deficiency decreased final BW and empty BW of both pig types ($P < 0.001$), although empty BW/BW ratio remained unchanged. The proportions of whole carcass and viscera (g/kg empty BW) were similar for both breeds of pigs when fed AL diet, although Iberian pigs fed DL diet showed increased viscera and decreased carcass proportions (genotype \times diet interaction, $P < 0.01$). Relative weight of stomach, kidney and mesenteric fat was higher ($P < 0.001$), and small intestine lower ($P < 0.05$) in Iberian pig compared to LDW pigs. The whole digestive tract and large intestine proportions decreased in LDW pigs fed DL diet respect to the rest of groups (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). Liver and mesenteric fat proportions increased ($P < 0.01$), and heart relative weight tended to decrease ($P = 0.061$) in pigs consuming the DL diet.

Table 1Effect of genotype and dietary lysine content on body and carcass components of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹.

Pig genotype	Iberian		LDW		SEM	P-Value ²			
	Diet	AL	DL	AL		DL	Gen	Diet	Gen × diet
Final BW, kg		26.6	24.2	26.2	22.1	0.8	NS	***	NS
Empty BW, kg		24.4	22.2	24.1	20.4	0.7	NS	***	NS
Empty BW/ final BW		0.920	0.919	0.933	0.923	0.007	NS	NS	NS
Body components, g/kg empty BW									
Carcass ³		790 ^a	779 ^b	791 ^a	795 ^a	3	**	NS	**
Total viscera		155 ^b	166 ^a	154 ^b	150 ^b	3	**	NS	**
Digestive tract		66.2 ^a	68.8 ^a	66.0 ^a	62.1 ^b	1.7	0.091	NS	*
Stomach		11.6	10.9	9.24	8.99	0.28	***	NS	NS
Small intestine		32.8	35.5	37.5	36.1	1.1	*	NS	0.081
Large intestine		21.8 ^a	22.4 ^a	20.2 ^a	17.0 ^b	0.8	***	NS	*
Kidneys		6.05	5.80	5.13	4.81	0.23	***	NS	NS
Liver		30.4	37.3	30.2	33.8	1.3	NS	***	NS
Mesenteric fat		14.9	17.3	11.7	12.9	0.5	***	**	NS
Heart		5.41	4.94	5.81	5.33	0.24	NS	0.061	NS
Carcass components, g/kg carcass									
Loin		47.4	40.8	62.7	48.0	2.2	***	***	0.078
Ham		322	278	341	317	6	***	***	0.098
Shoulder		269	256	260	245	4	*	**	NS
Sirloin		8.89	7.38	10.87	9.07	0.53	**	**	NS
Butt lean		31.2	34.6	34.4	44.2	2.2	0.055	*	NS
Ribs		94	112	101	116	5	NS	**	NS
Spine		65.8	78.2	60.6	91.4	4.9	NS	***	0.075
Kidney fat		13.3	19.3	6.51	12.5	1.23	***	***	NS
Belly		114.9	117.1	92.3	81.9	5.7	***	NS	NS
Backfat		26.7 ^b	40.9 ^c	18.6 ^a	26.2 ^b	1.6	***	***	*

^{a-c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).¹n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = Lysine-adequate diet (1.09% Lys); DL = Lysine-deficient diet (0.52% Lys).²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.³Including head, feet and tail.

Most of relative weights of lean components (g/kg carcass) were heavier in LDW pigs (loin, ham, sirloin, $P < 0.01$), except for shoulder ($P < 0.05$). Lean components proportions decreased in pigs fed the LD diet ($P < 0.05$ to $P < 0.001$). Butt lean tended to be higher in LDW pigs ($P = 0.055$) and increased in DL fed pigs ($P < 0.05$). Ribs and spine proportions increased ($P < 0.01$) in DL fed pigs of both genotypes. Belly, kidney fat and backfat proportions were higher in Iberian pigs ($P < 0.001$). Kidney fat increased in pigs fed DL diets ($P < 0.001$) as well as backfat (particularly in Iberian pigs; genotype \times diet interaction, $P < 0.05$).

The carcass chemical composition -shown in Table 2- was in line with the physical dissection of carcass components presented above. Iberian pigs showed less water and more lipid (g/kg carcass) and energy content (MJ/kg carcass) than LDW pigs ($P < 0.01$). When pigs were fed LD diet, carcass protein concentration decreased (more in Iberian pigs, genotype \times diet interaction; $P < 0.01$) and lipid and energy contents increased ($P < 0.01$). Ash content decreased in LDW pigs fed DL diet (genotype \times diet interaction; $P < 0.01$).

Table 2

Effect of genotype and dietary lysine content on carcass chemical composition of piglets growing from 10 to 25 kg BW (wet basis)¹

Pig genotype Diet	Iberian		LDW		SEM	P-Value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen \times diet
Protein, g/kg	152 ^a	126 ^c	150 ^a	132 ^b	1	NS	***	**
Water, g/kg	607	551	687	620	5	***	***	NS
Water:protein ratio	4.00 ^c	4.37 ^b	4.59 ^a	4.69 ^a	0.05	***	***	*
Fat, g/kg	210	293	134	216	6	***	***	NS
Ash, g/kg	31.4 ^{ab}	30.1 ^{ab}	29.3 ^b	32.2 ^a	0.8	NS	NS	*
GE, MJ/kg	11.6	14.3	8.75	11.3	0.25	***	***	NS

^{a-c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype \times diet combination; LDW = Landrace \times Large White pigs; AL = Lysine-adequate diet (1.09% Lys); DL = Lysine-deficient diet (0.52% Lys).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The fatty acid composition of carcass appears in Table 3. Iberian pigs showed greater proportion of C16:0 ($P < 0.05$). No significant differences were found for C17:0, C18:0, C18:1 n-9, total SFA and MUFA between genotypes. Proportions of C18:2 n-6, C18:3 n-3, and some of linoleic and linolenic acid derivatives (C20:4 n-6; C22:5 n-3 and C22:6 n-3), and total PUFA, were higher in LDW pigs ($P < 0.01$). Pigs

receiving the DL diet had higher content of C18:0 ($P < 0.05$) and lower of C18:2 n-6, C18:3 n-3, and total PUFA ($P < 0.01$), with a consequent decrease of the n-6/n-3 ratio ($P < 0.05$) than pigs fed the AL diet.

Table 3

Effects of genotype and dietary lysine content on the FA composition (g FA/ 100g of identified FA methyl esters) of carcass of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Pig genotype Diet	Iberian		LDW		SEM	P-Value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
C14:0	1.41 ^b	1.44 ^b	1.40 ^b	1.04 ^a	0.07	*	*	*
C16:0	25.5	26.3	24.0	24.1	0.8	*	NS	NS
C16:1	3.91	3.72	3.98	2.83	0.24	NS	*	0.063
C17:0	0.396	0.414	0.445	0.454	0.045	NS	NS	NS
C18:0	11.0	11.3	10.5	12.4	0.5	NS	*	0.095
C18:1 n-9	40.2	41.0	39.2	40.8	0.8	NS	NS	NS
C18:1 n-7	3.86	3.77	3.81	3.32	0.13	0.081	*	NS
C18:2 n-6	9.31	8.45	12.2	10.4	0.26	***	***	0.082
C18:3 n-6	0.033	0.021	0.035	0.026	0.002	NS	***	NS
C20:1 n-9	0.723	0.834	0.715	0.929	0.030	NS	***	0.098
C18:3 n-3	0.365	0.343	0.473	0.421	0.017	***	*	NS
C20:3 n-6	0.106	0.103	0.115	0.114	0.006	NS	NS	NS
C20:4 n-6	0.491	0.560	1.074	0.875	0.072	***	NS	0.075
C20:5 n-3	0.052	0.124	0.141	0.255	0.081	NS	NS	NS
C22:5 n-3	0.037	0.040	0.055	0.051	0.004	**	NS	NS
C22:6 n-3	0.014	0.014	0.028	0.025	0.003	***	NS	NS
Total SFA ³	38.5	39.7	36.6	38.3	1.1	NS	NS	NS
Total MUFA	48.9	49.6	47.9	48.1	1.8	NS	NS	NS
Total PUFA	11.0	10.3	14.9	12.9	0.3	***	***	0.093
ω-6:ω-3 ratio	20.4	17.2	18.7	16.7	1.2	NS	*	NS

^{a-b} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; FA= fatty acids; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = Lysine-adequate diet (1.09% Lys); DL = Lysine-deficient diet (0.52% Lys).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Lipogenic enzyme activity

In subcutaneous backfat adipose tissue, Iberian pigs had similar FAS and higher ME and G6PD activities ($P < 0.01$) than LDW pigs (Table 4). In both breeds, lysine deficiency decreased ME activity ($P < 0.05$) and tended to decreased G6PD activity ($P = 0.096$). The FAS activity was decreased only in LDW pigs fed DL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). In *I. dorsi*, the activity of FAS was higher in Iberian pigs ($P < 0.001$) and increased in both pig types fed DL diet ($P < 0.001$). The ME and G6PDH activities did not significantly differ between genotypes, and both enzymes increased their activity in lysine deficient pigs ($P < 0.01$). For *b. femoris* muscle no significant differences in enzymatic activities between genotypes when pigs were fed AL diet were detected. The FAS activity was raised ($P < 0.001$) and G6PDH activity tend to increase ($P = 0.053$) in lysine deficient pigs. When pigs were fed DL diet, ME activity increased in Iberian but not in LDW pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$).

Table 4

Effect of genotype and dietary lysine content on lipogenic enzyme activities of backfat adipose tissue and muscles of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹.

Pig genotype	Iberian		LDW		SEM	P-Value ²		
	Diet	AL	DL	AL		DL	Gen	Diet
Backfat³								
FAS	98.5 ^a	86.2 ^a	90.5 ^a	45.5 ^b	7.2	**	***	*
ME	2399	2008	1674	1300	178	***	*	NS
G6PD	633	588	539	474	32	**	0.096	NS
<i>Longissimus dorsi</i>								
FAS	0.88	1.66	0.36	0.81	0.15	***	***	NS
ME	22	43.7	24.1	29.9	4.4	NS	**	0.085
G6PD	1.47	4.1	1.61	2.22	0.5	0.096	**	0.056
<i>Biceps femoris</i>								
FAS	0.34	0.68	0.20	0.96	0.13	NS	***	NS
ME	15.8 ^a	36.3 ^b	13.5 ^a	17.1 ^a	3.4	**	**	*
G6PD	1.44	2.59	2.16	2.69	0.41	NS	0.053	NS

^{a-b} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype \times diet combination; LDW = Landrace \times Large White pigs; AL = Lysine-adequate diet (1.09% Lys); DL = Lysine-deficient diet (0.52% Lys).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

³FAS= fatty acid synthase; ME= malic enzyme; G6PDH= glucose-6-phosphate dehydrogenase. Activities were expressed in nmoles of NADPH produced (ME, G6PDH) or consumed (FAS) per min and per mg cytosolic proteins.

Lipogenic enzyme gene expression

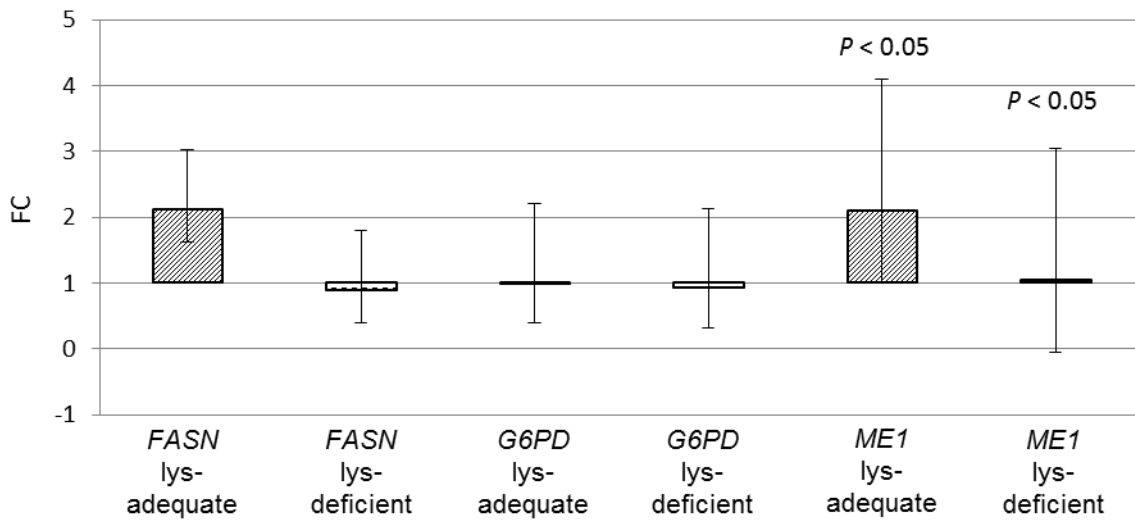
The expression of *FASN*, *G6DH* and *ME1* genes was assessed in the subcutaneous backfat adipose tissue and in *l. dorsi* and *b. femoris* muscles of all pigs. Results are given as the difference between genotypes, fed adequate or lysine deficient diets (part A of the figures) and the differences between diets within each genotype (part B). Differences were expressed as fold changes.

In backfat tissue, *FASN* expression did not show differences between Iberian and LDW pigs (Figure 1A), although *FASN* was upregulated in Iberian pigs, and downregulated in LDW pigs when consuming the AL diet ($P < 0.001$; Figure 1B). There were differences in expression of *G6DH* for pigs fed DL diet (genotype \times diet interaction, $P = 0.01$). Compared to pigs fed AL diet, *G6DH* tended to be downregulated in Iberian pigs, and upregulated in LDW pigs, when both pig types were fed DL diet (Figure 1B). The *ME1* expression was upregulated in Iberian compared to LDW pigs (Figure 1A) with no differences in expression related to lysine deficiency (Figure 1B).

In *l. dorsi* muscle, expression of *FASN* was higher in Iberian compared to LDW pigs for AL fed pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.001$, Figure 2A). In Iberian pigs *FASN* expression was upregulated in pigs fed DL diet respect to AL fed pigs ($P < 0.001$, Figure 2B). For *G6DH* expression, the only significant difference observed was an upregulation in Iberian pigs fed DL diet respect to Iberian pigs fed AL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$, Figures 2A and 2B). The same result was obtained for *ME1* expression (genotype \times diet interaction, $P < 0.01$, Figures 2A and 2B).

For the *b. femoris* muscle, in Iberian pigs the expression of *FASN* was higher in pigs fed DL diet respect to pigs fed AL pigs (genotype \times diet interaction; $P < 0.05$, Figures 3A and 3B). The *G6DH* expression was upregulated in Iberian compared to LDW pigs ($P < 0.05$; Figure 3A). No significant effects of lysine deficiency were observed for *G6DH* expression (Figure 3B). In the case of *ME1* expression, in both genotypes it was upregulated in DL pigs compared to AL pigs; and it was higher in Iberian pigs fed DL diet respect to LDW fed DL diet (genotype \times diet interaction; $P < 0.001$, Figures 3A and 3B).

A Effects of genotype: Iberian respect to Landrace × Large-White pigs



B Effects of diet: adequate respect to lysine deficient

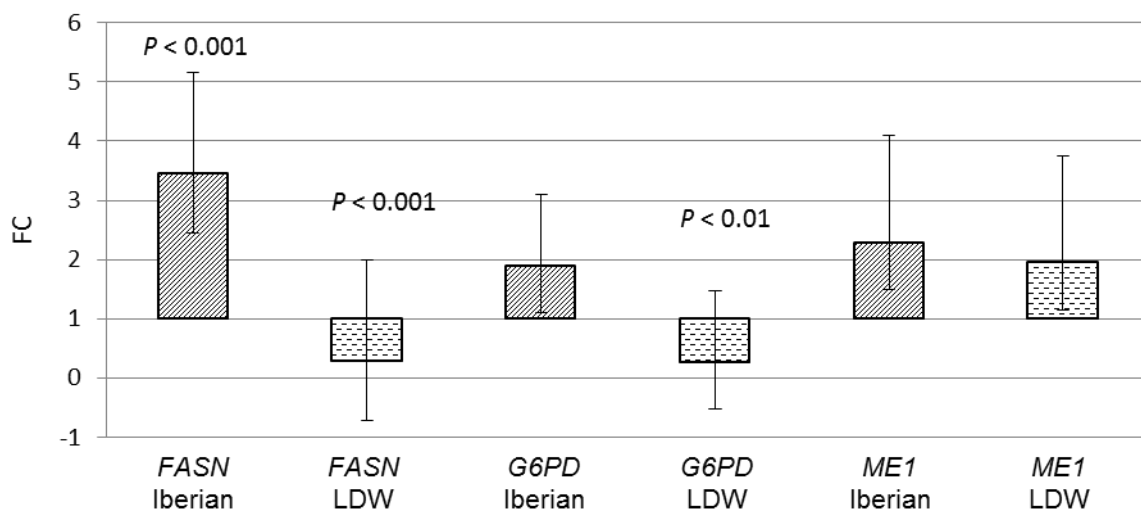


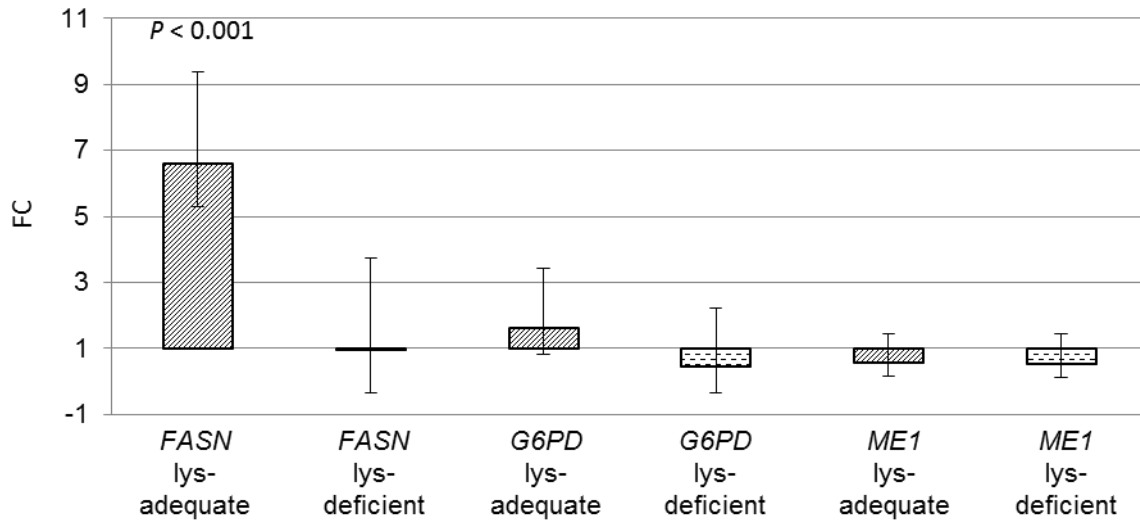
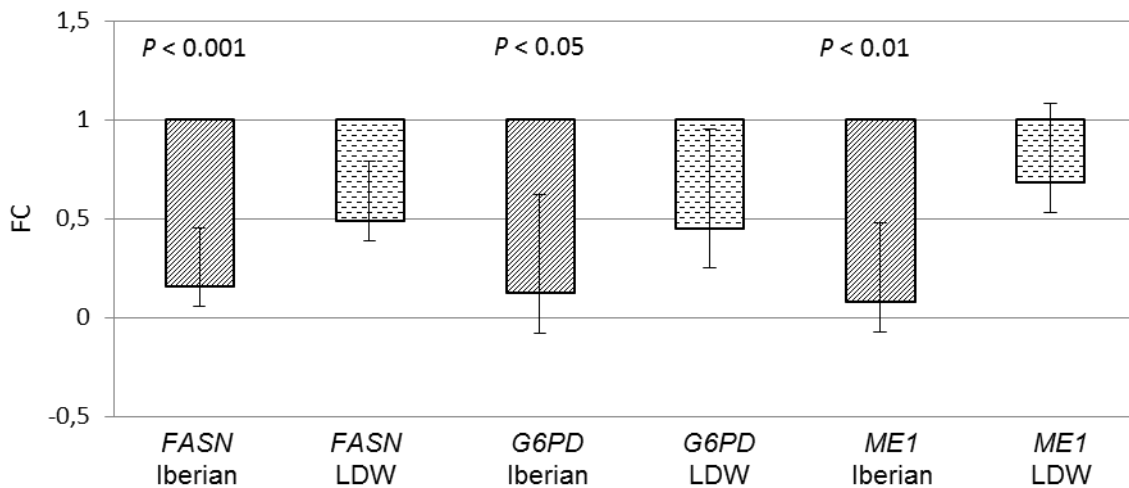
Figure 1

A Gene expression of lipogenic enzymes in backfat adipose tissue of Iberian with respect to Landrace × Large-White pigs both fed adequate or lysine deficient diets (FC, Fold change)

B Gene expression of lipogenic enzymes in backfat adipose tissue of Iberian and Landrace × Large-White (LDW) pigs fed adequate lysine diets respect to pigs fed lysine deficient diets (FC, Fold change)

Significant differences between fold changes are indicated with the P value.

FASN: fatty acid synthase; *G6DH*: glucose-6-phosphate dehydrogenase; *ME1*: malic enzyme

A Effects of genotype: Iberian respect to Landrace × Large-White pigs**B** Effects of diet: adequate respect to lysine deficient**Figure 2**

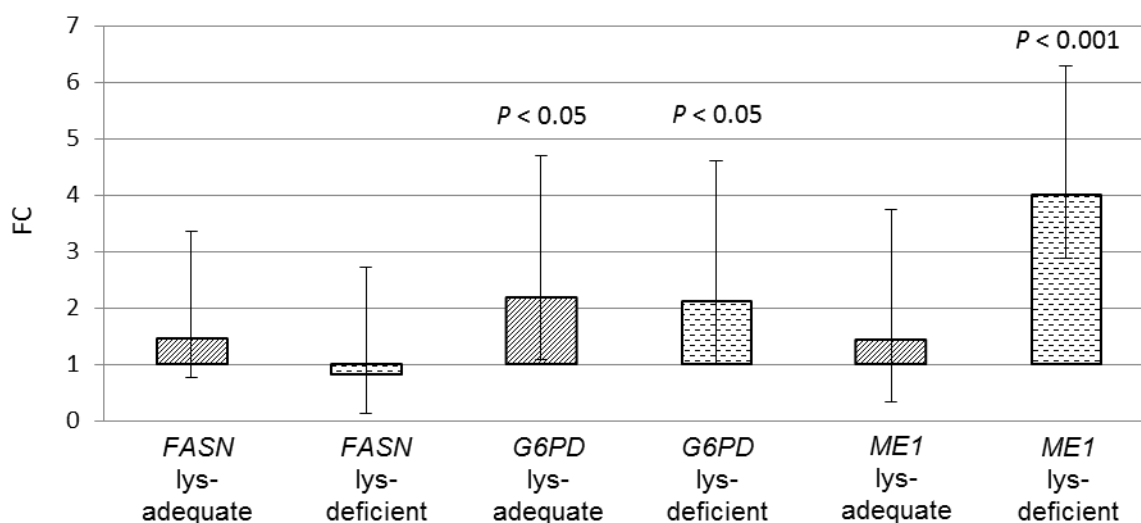
A Gene expression of lipogenic enzymes in *longissimus dorsi* muscle of Iberian with respect to Landrace × Large-White pigs both fed adequate or lysine deficient diets (FC, Fold change)

B Gene expression of lipogenic enzymes in *longissimus dorsi* muscle of Iberian and Landrace × Large-White pigs (LDW) fed adequate lysine diets respect to pigs fed lysine deficient diets (FC, Fold change).

Significant differences between fold changes are indicated with the *P* value.

FASN: fatty acid synthase; *G6DH*: glucose-6-phosphate dehydrogenase; *ME1*: malic enzyme

A Effects of genotype: Iberian respect to Landrace × Large-White pigs



B Effects of diet: adequate respect to lysine deficient

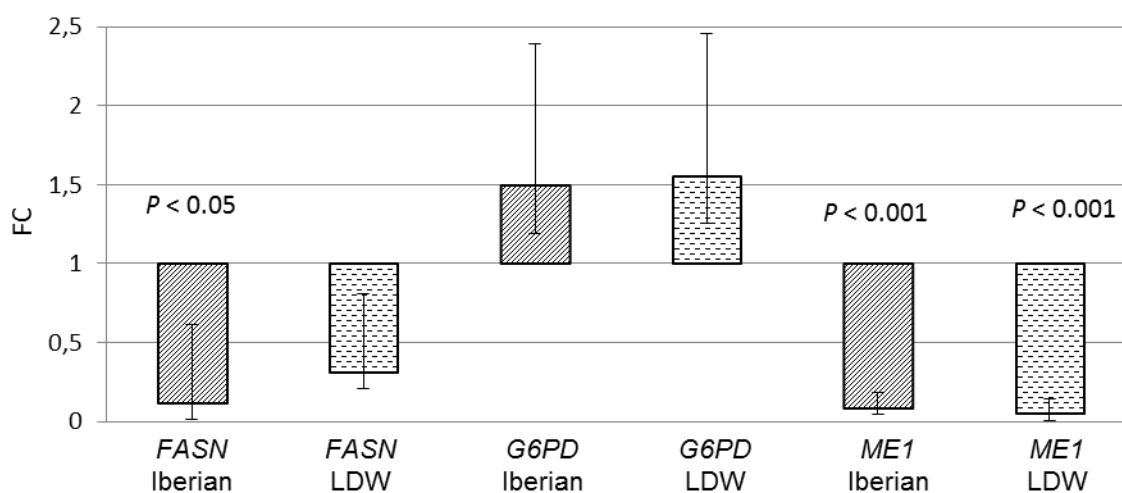


Figure 3

A Gene expression of lipogenic enzymes in *biceps femoris* muscle of Iberian with respect to Landrace × Large-White pigs both fed adequate or lysine deficient diets (FC, Fold change)

B Gene expression of lipogenic enzymes in *biceps femoris* muscle of Iberian and Landrace × Large-White pigs (LDW) fed adequate lysine diets respect to pigs fed lysine deficient diets (FC, Fold change).

Significant differences between fold changes are indicated with the *P* value.

FASN: fatty acid synthase; *G6DH*: glucose-6-phosphate dehydrogenase; *ME1*: malic enzyme

DISCUSSION

The Iberian pig is an autochthonous, slow-growing, fatty-type pig reared in the southwest of Spain, known for the quality of its products. Nowadays they represent approximately 10% of total pigs produced in Spain (MAGRAMA, 2017). Lysine deficient diets have been shown as an effective nutritional approach to increase IMF deposition in conventional (Katsumata, 2011; Tous *et al.* 2014) and fatty-type pigs (Palma-Granados *et al.* 2017a). The purpose of this study was to explore further the mechanisms involved in intramuscular fat deposition, and to investigate the effects on backfat adipose tissue and growth of body components (as a potential negative effects) of pigs under lysine deficient conditions, to gather more information and complement previous results. To avoid some of the difficulties encountered when comparing breeds of different growth potential, young pigs of the same weight at the start of the experiment, and very close in age (and in nutritional requirements; Conde-Aguilera *et al.*, 2011) have been used.

Effects on body components and carcass composition

Visceral organ relative weights remained unchanged when pigs were fed the DL diet, except for the large intestine and the whole digestive tract that were reduced in LDW pigs, and liver and mesenteric fat that increased in both types of pigs fed DL diet. Conde-Aguilera *et al.* (2010) reported an increase in intestine, liver and blood proportions of young Piétrain × (Large-White × Landrace) pigs fed a diet deficient in sulfur amino acids for approximately 20 days. However, no significant effects on liver and small intestine relative weights were detected when pigs consumed a sulfur deficient diet for a longer period (17 weeks; Conde-Aguilera *et al.*, 2014), which could indicate that under lack of nutrients conditions animals probably tend to preserve visceral organs -with essential body functions- in detriment of muscle.

The relative proportions of carcass components showed, as anticipated, higher leaner components in LDW pigs (loin, ham, sirloin, except for shoulder), and greater relative weights of fatty components in Iberian pigs (belly, backfat, internal fat), corroborating the predisposition to fat deposition in the carcass of Iberian pigs (Nieto *et al.*, 2013). When pigs were fed diet DL similar effects were found, in general, on relative weights of carcass components for both types of pigs, i. e., a reduction of leaner parts and an increment of the predominantly fatty components, respectively,

in close agreement with the changes in carcass chemical composition detected (declining of protein and water contents and increasing of lipid and energy contents). These effects are in line with others described in the literature, as reduction of nitrogen retention (Roy *et al.*, 2000; Rivera-Ferre *et al.*, 2006) and in muscle fractional protein synthesis rates (Rivera-Ferre *et al.*, 2005) when pigs are fed diets with insufficient lysine supply. In young conventional piglets fed sulfur deficient diets, Conde-Aguilera *et al.* (2010) also found lower protein and water concentration and greater lipid deposition in the carcass than in control pigs. However, other authors that found an increment of IMF when feeding pigs with lysine deficient diet (Katsumata *et al.*, 2005) or protein deficient diet (Doran *et al.*, 2006) did not found increased backfat depth, which can be considered as an indicator of total lipid deposition in carcass. Probably, the reasons for these discrepancies stem from differences in the age of pigs, much younger in the present case and in the study of Conde-Aguilera *et al.* (2010), and probably more susceptible to deficiencies in amino acid supply.

In the present case, the genotype differences found regarding carcass fatty acid profile are related mainly to the proportion of PUFA, which are higher in the LDW, pigs with no genotype differences for oleic acid or total MUFA proportions. Native pig breeds present higher rates of MUFA and oleic acid deposition (probably related to higher *de novo* lipid synthesis), meanwhile, in conventional-type pigs a more saturated fatty acid profile, along with higher relative levels of PUFA, mainly linoleic acid, are found (Pugliese and Sirtori, 2012). We have observed such genotype differences in backfat fatty acid composition of Iberian and conventional pigs (Barea *et al.*, 2013) and also in IMF fatty acid composition of muscles (Palma-Granados *et al.*, 2017b). In this work, when pigs of both genotypes were fed DL diet, there was a slight increase of C18:0 content and a general decrease of PUFA in carcass fatty acid profile, indicative of increased *de novo* synthesis of SFA and MUFA (Gerfault *et al.*, 2000), although no significant effect was detected for the relative proportions of these two groups of fatty acids in DL fed pigs. Carcass fatty acid profile represents the composition of whole lipid content of the pig (except for head, feet and tail), driven mainly by backfat composition. In contrast, the IMF fatty acid profile showed a clear increase in oleic acid in DL fed pigs (Palma-Granados *et al.*, 2017a).

Effects on lipogenic enzyme activity and gene expression

To investigate further possible mechanism involved in fat deposition promoted by dietary lysine deficiency, and potential differential responses in fat deposited in tissues such as muscle and subcutaneous backfat of the two pig types, the activity and gene expression of key lipogenic enzymes were determined: FAS -which catalyzes palmitate synthesis pathway from malonil-CoA-, and ME and G6PDH -involved in providing NADH for the reductive biosynthesis of fatty acids-. The amount of lipid deposited in pig tissues depend on the balance among deposition from dietary lipids, synthesis *de novo* and fatty acid oxidation. Kloareg *et al.* (2007) suggested that synthesis *de novo* in tissues represents more than 80% of total fatty acid deposition in pigs; therefore, lipogenic pathways would have a major role determining lipid deposited in tissues. Although there are some discrepancies, in general, the catalytic activity determined in each tissue is corroborated by the analysis of expression of genes codifying these enzymes. In general, we observed a greater capacity for tissue lipid synthesis in Iberian pigs (greater ME and G6PD activities, and higher *ME1* expression in backfat; higher FAS activity and *FASN* expression in *l. dorsi*; and higher ME activity and *G6P* and *ME1* expression in *b. femoris*), which agrees with previous reports comparing lipogenic enzyme activities in lean and Alentejano piglets (fatty pig similar to the Iberian; Freire *et al.*, 1998), and in fattening Iberian and conventional pigs (Morales *et al.*, 2002). However, in 15-day old suckling piglets of the same genotypes used in the present study, we were not able to detect genotype differences in lipogenic activity for backfat and *l. dorsi* (Palma-Granados *et al.*, 2017c), although these differences may have develop further as pigs get older.

The effects of lysine deficiency on enzymatic lipogenic activity and gene expression were different in subcutaneous backfat tissue and the muscles studied. In spite of backfat proportions increased in Iberian and LDW pigs when consuming the DL diet, the activity and gene expression of the lipogenic enzymes in general decreased or were unchanged. Madeira *et al.* (2013) did not found changes in *FASN* expression in backfat of lysine deficient pigs. In contrast, in young Pietrain × LDW piglets fed a methionine deficient diet, the activity of FAS, ME and G6PH was raised and upregulation of *FASN* and *ME1* genes was observed in backfat as lipid content increased (Castellano *et al.*, 2015), which point out potential different effects of methionine and lysine deficiency on adipose tissue lipogenesis.

There were no correlation among subcutaneous backfat proportions and enzymatic activities in pigs of the present work. Other mechanism, apart from *de novo* fatty acid and triglycerides synthesis should be involved in the increment in backfat adipose tissue on DL fed pigs (increased deposition of dietary fatty acids, reduced lipolysis rates or both). In contrast, in pigs fed DL diet, the IMF content of *l. dorsi* showed a strong correlation with the activity of FAS (0.8), G6PDH (0.6) and ME(0.7), that were also in line with upregulation of gene expression in this muscle, particularly in Iberian pigs. In the case of *b. femoris*, increased IMF content in DL fed pigs was linked to increased activity of FAS and ME enzymes, and *ME1* upregulation (and *FASN* in the case of Iberian pigs). In this sense, in conventional pigs fed reduced protein (Doran *et al.*, 2006) and lysine diets (Madeira *et al.*, 2013), IMF increase in *longissimus* muscle was related to increased protein and gene expression of SCD enzyme, respectively, but not effects were detected in backfat adipose tissue. Our suggest point out, in agreement with others (Mourot and Kouba, 1999; Gondret and Lebret, 2002) the close relationship between ME activity and IMF deposition, as this is, by far, the lipogenic enzyme with higher activity rates in muscle.

The present results suggest that lipogenic enzyme activities and gene expression are regulated differently in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle of in piglets. As pointed out by Gondret and Lebret (2002), the differences found in the present study in the effect of lysine deficiency among backfat adipose tissue and muscle regarding enzymatic activity and gene expression, may be related to the fact that IMF is the last fat deposit to develop, and may respond to nutritional changes in a different way to other fat depots.

Lysine deficient diets can be a suitable strategy to increase IMF content in fatty and lean pigs, although appropriate nutritional strategies should be designed to avoid decrease of growth of leaner carcass components. For each pig type, tailored diets - including specific lysine restriction- need to be further developed to schedule duration and specific starting time of the treatment at the fattening period. In both fatty and lean piglets, the lipogenic effect of lysine deficiency seems to be tissue specific, promoting an activation of the lipogenic enzyme systems of both *l. dorsi* and *b. femoris* muscle with no apparent stimulation of lipogenesis in backfat adipose tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO grant No. AGL2011-25360). P. Palma-Granados had fellowship from the Spanish MICINN FPI Program (BES-2012-053078). The assays described are part of the doctoral thesis of P. Palma-Granados, under the Doctoral Program of Granada University, Spain. We thank Miguel A. Liñán and Isabel M. Romero for skillful technical assistance. We are also very grateful to Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. (El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain) for providing Iberian purebred experimental animals. Corn gluten meal and corn starch used in this experiment were kindly provided by Tereos Syral (Zaragoza, Spain).

REFERENCES

- Ayuso M, Fernández A, Isabel B, Rey A, Benítez R, Daza A, López-Bote CJ and Óvilo C 2015. Long term vitamin A restriction improves meat quality parameters and modifies gene expression in Iberian pigs. *Journal of Animal Science* 93, 2730–2744.
- Barea R, Isabel B, Nieto R, López-Bote C and Aguilera JF 2013. Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and Landrace× Large White pigs. *Animal* 7, 688-698.
- Bazin R and Ferre P. Assays of lipogenic enzymes. *Methods Mol Biol.* 2001; 155: 121–127. PMID:11293064
- Castellano R, Perruchot MH, Conde-Aguilera JA, van Milgen J, Collin A, Tesseraud S, Mercier Y and Gondret F 2015. A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. *PLoS one*, 10, e0130514.
- Conde-Aguilera JA, Aguinaga MA, Aguilera JF and Nieto R 2011. Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with different protein concentrations. *Journal of Animal Science* 89, 754-763.
- Conde-Aguilera JA, Barea R, Le Floc'h N, Lefaucheur L and van Milgen J 2010. A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal* 4, 1349–1358.
- Conde-Aguilera JA, Cobo-Ortega C, Mercier Y, Tesseraud S and van Milgen J 2014. The amino acid composition of tissue protein is affected by the total sulfur amino acid supply in growing pigs. *Animal* 8, 401-409.
- Doran O, Moule SK, Teye GA, Whittington FM, Hallett KG and Wood JD 2006. A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in

- subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *British Journal of Nutrition* 95, 609-617.
- Font-i-Furnols M, Tous N, Esteve-Garcia E and Gispert M 2012. Do all the consumers accept marbling in the same way? The relationship between eating and visual acceptability of pork with different intramuscular fat content. *Meat Science* 91, 448-453.
- Freire JPB, Mourot J, Cunha LF, Almeida JAA, Aumaitre A 1998. Effect of the source of dietary fat on postweaning lipogenesis in lean and fat pigs. *Annals of Nutrition and Metabolism* 42, 90-95.
- Gerfault V, Louveau I, Mourot J and Le Dividich J 2000. Lipogenic enzyme activities in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle from neonatal pigs consuming maternal or formula milk. *Reproduction Nutrition Development* 40, 103-112.
- Gondret F and Lebret B 2002. Feeding intensity and dietary protein level affect adipocyte cellularity and lipogenic capacity of muscle homogenates in growing pigs, without modification of the expression of sterol regulatory element binding protein. *Journal of Animal Science* 80, 3184-3193.
- Katsumata M 2011. Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. *Animal Science Journal* 82, 17-25
- Katsumata M, Kobayashi SI, Matsumoto M, Tsuneishi E and Kaji Y 2005. Reduced intake of dietary lysine promotes accumulation of intramuscular fat in the Longissimus dorsi muscles of finishing gilts. *Animal Science Journal* 76, 237-244.
- Kloareg M, Noblet J and van Milgen J 2007. Deposition of dietary fatty acids, de novo synthesis and anatomical partitioning of fatty acids in finishing pigs. *British Journal of nutrition* 97, 35-44.
- Madeira MS, Pires VM, Alfaia CM, Costa AS, Luxton R, Doran O, Bessa RJB and Prates JA 2013. Differential effects of reduced protein diets on fatty acid composition and gene expression in muscle and subcutaneous adipose tissue of Alentejana purebred and Large White× Landrace× Pietrain crossbred pigs. *The British Journal of Nutrition* 110, 216-229.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) 2016. Producción y mercados ganaderos. Porcino. (In Spanish.) <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/default.aspx>. (Accessed 15 October 2017.)
- Morales J, Pérez JF, Baucells MD, Mourot J and Gasa J 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn and corn-sorghum-acorn based diets. *Livestock Production Science* 77, 195-205.
- Mourot J and Kouba M 1999. Development of intra-and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development* 39, 125-132.

- Nieto R, Barea R, Lara L, Palma-Granados P, Aguilera JF 2015. Lysine requirement relative to total dietary protein for optimum performance and carcass protein deposition of Iberian piglets. *Animal Feed Science and Technology* 206, 48-56.
- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Conde-Aguilera JA and Aguilera JF 2013. Growth of body components and carcass composition of Iberian pigs of 10 to 150 kg body weight as affected by the level of feeding and dietary protein concentration. *Journal of Animal Science* 91, 4197-4207.
- Palma-Granados P, Haro A, Lara L, Aguilera JF, Nieto R and Seiquer I 2017b. Differences on meat colour and composition between “Landrace × Large White” and “Iberian” pigs under identical nutritional and management conditions. *Animal Production Science*. doi.org/10.1071/AN16375, Publishing online by Csiro Publishing 19 July 2017.
- Palma-Granados P, Haro A, Seiquer I, Lara L, Aguilera JF and Nieto R 2017a. Similar effects of lysine deficiency in muscle biochemical characteristics of obese and lean piglets. *Journal of Animal Science* 95, 3025-3036.
- Palma-Granados P, Seiquer I and Nieto R 2017c. Actividad de enzimas lipogénicas en grasa dorsal y longissimus dorsi de lechones ibéricos y Landrace x Large White. (*Lipogenic enzyme activity in backfat adipose tissue and longissimus dorsi muscle of Iberian and Landrace × Large-White piglets*). XVII Jornadas sobre Producción Animal, AIDA, 30-31 May 2017, Zaragoza, Spain, pp. 249-251.
- Pugliese C and Sirtori F 2012. Quality of meat and meat products produced from southern European pig breeds. *Meat Science* 90, 511-518.
- Rivera-Ferre MG, Aguilera JF and Nieto R 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Nutrition* 135, 469-478.
- Rivera-Ferre MG, Aguilera JF and Nieto R 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science* 84, 3346-3355.
- Roy N, Lapierre H and Bernier JF 2000. Whole-body protein metabolism and plasma profiles of amino acids and hormones in growing barrows fed diets adequate or deficient in lysine. *Canadian Journal of Animal Science* 80, 585-595.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM and Rosa GJM 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146-152.
- Tous N, Lizardo R, Vila B, Gispert M, Font-i-Furnols M and Esteve-Garcia E. 2014. Effect of reducing dietary protein and lysine on growth performance, carcass characteristics, intramuscular fat, and fatty acid profile of finishing barrows. *Journal of Animal Science* 92, 129-140.

Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI and Whittington FM
2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78,
343-358.

Differences on meat colour and composition between “Landrace × Large White” and “Iberian” pigs under identical nutritional and management conditions

Patricia Palma-Granados, Ana Haro, Luis Lara, José F. Aguilera, Rosa Nieto and Isabel Seiquer

Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain



Animal Production Science

<http://dx.doi.org/10.1071/AN16375>

Received 9 June 2016

Accepted 28 May 2017

Published online 19 July 2017

ABSTRACT

In pig production, factors such as nutritional system and genotype affect quality characteristics of meat. This study was aimed to evaluate differences in nutritional composition and colour of meat between Iberian (IB) and Landrace × Large White (LLW) pigs reared under identical nutrition and management conditions. Nutrient composition, mineral content, fatty acid profile and instrumental colour of two muscles (*longissimus thoracis* and *biceps femoris*) were examined at two growing stages (50 and 115 kg weight). Significant differences were found in relation to genotype. IB muscles contained higher amounts of intramuscular fat, dry matter, monounsaturated fatty acids, iron and zinc, and were redder (higher a^* value) and with less colour saturation (lower hue angle), than those from LLW pigs. Significant relationships between colour coordinates with the mineral content and the lipid profile of muscles were found: redness was mainly linked to Fe, Zn and monounsaturated fatty acids levels, whereas yellowness was positively related with Cu, polyunsaturated fatty acids and linoleic acid level. The results of the present study support that muscles from the IB pig genotype have special characteristics which may enhance the overall quality of meat compared with conventional or high-lean porcine breeds, even under identical management system, due to its particular fat composition and colour attributes.

Keywords: pigs, meat composition, meat quality, fatty acids, iron.

INTRODUCTION

Nutritional composition of porcine meat is strongly involved in meat quality characteristics and may be affected by many factors, such as genotype, age, sex, production system and nutritional regime. Meat and meat products of Iberian (IB) pigs are highly appreciated by consumers, and aspects such as the amount and composition of intramuscular fat and the great concentration of heme pigments have been highlighted among the most relevant factors influencing quality of IB meat (Ventanas *et al.* 2006). The influence of the lipid fraction in the quality of fresh meat has been also well established in other breeds (Cameron *et al.* 2000; Straadt *et al.* 2013). In addition, colour is an important characteristic of meat and it is assumed that it may influence the consumer choice of the pieces (Carrapiso and Garcia 2005). Due to the great importance of meat colour as a quality trait of meat, attention has been paid to study the influence on this parameter of a large number of factors, such as genotype (Lebret *et al.* 2011), crossbreeding (Carrapiso and Garcia 2005; Ramirez and Cava 2007; Fuentes *et al.* 2014) or production system (Tejerina *et al.* 2012). Meat colour has been mainly related to heme pigments and total intramuscular fat in several studies (Ventanas *et al.* 2006; Gonzalez *et al.* 2012), whereas relationships with mineral composition have received little attention. However, mineral content is essential concerning quality and nutritional traits of meat, since meat is an excellent source of minerals such as iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn) and phosphorus (P), and plays an important role in the prevention of Zn and Fe deficiency (Pereira and Vicente 2013). The level of dietary protein and essential amino acids may also affect fat deposition in pigs, both in lean (Lambe *et al.* 2013) and in IB genotypes (Nieto *et al.* 2002); in turn, the pattern of fat deposition may be determinant for meat quality, as intramuscular fat has potential sensory benefits (Teye *et al.* 2006).

Previous works of our research group have shown the effects of pig genotype (IB vs lean-type pigs) and protein levels on performance, nutrient digestibility and structural aspects of the small intestine (Barea *et al.* 2011). Moreover, we have also reported significant differences between IB and lean pigs in the fatty acid (FA) profile of subcutaneous fat (Barea *et al.* 2013). Special characteristics of meat from IB pigs have been related with a particular production system and diet (Tejerina *et al.* 2012). However, comparisons between IB and lean breeds, under the same nutritional and environmental management, in relation to composition and colour of muscles, have not been reported. The current study was undertaken to evaluate the nutritional

composition in muscles of two pig genotypes (IB and Landrace × Large White, LLW) at different stages of growth (50 and 115 kg of body weight (BW)) and the possible relationships among chemical composition and instrumental colour. As the dietary protein requirements differ between these genotypes (Nieto *et al.* 2002), the comparison was made at two protein levels, one of them close to an adequate supply of amino acids for each of the porcine breed under study, and the possible effects of dietary protein supply on the mentioned variables was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures and animal care were carried out in accordance with current Spanish legislation and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The authorization to experiment on living animals was approved by the Bioethical Committee of the Spanish National Research Council (CSIC, Spain).

Animals, diets and experimental design

Animals, diets and experimental design have been described previously (Barea *et al.* 2011). Briefly, 32 male castrated pigs (initial weight \approx 15 kg) from the IB or LLW breeds (n =16 per genotype) were supplied by Sanchez Romero Carvajal Jabugo SA (Cádiz, Spain) and Jodral Gutierrez SA (Córdoba, Spain), respectively. They were housed in individual pens (2m²), located in an environmentally controlled room. The pigs were fed one of the two diets (n=8 per diet and breed) differing in protein content: 13 % (low-protein, LP diet) or 17 % (high-protein, HP diet) as fed. Dietary protein level was fixed to meet or exceed the current recommendations for growing IB (13 %, Nieto *et al.* 2002; Barea *et al.* 2007) and lean pigs (17 %, BSAS 2003). Nutrients other than protein and energy content were formulated in order to be equivalent or to exceed requirements for growing lean type pigs (BSAS 2003). Ingredients and chemical composition of the diets have been published elsewhere (Barea *et al.* 2013). Feed allowance was established at 0.8 × *ad libitum* intake of the IB breed, which has higher intake capacity than LLW breed, and the intake was adjusted weekly on a BW basis, according to previous equations derived from Iberian pigs (Nieto *et al.* 2012). Water was freely available. Four pigs per treatment and genotype were slaughtered at a liveweight of 50 kg, whereas the remaining pigs were kept on

the trial until slaughter at 115 kg. Animals were laughtered by electronarcosis and exsanguination after a 12-h fast period. Immediately after slaughter, samples of muscles *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) were dissected from the left side of the carcass, freed from visible fat, vacuum packaged and stored at -80 °C until analysis. After 24h of chilling, the LT (a 2.5 cm slice at the last rib, first lumbar vertebra) and the BF (a 2.5 cm slice from its central part) from the right-hand side of the carcass were taken for colour measurement.

Analytical methods

Nutrient and mineral analyses

All analyses in muscles were performed in triplicate. Dry matter (method 934.01) and total ash content (method 942.05) were determined using official methods (AOAC 2000). Intramuscular fat (IMF) content was extracted with chloroform:methanol 2:1 and quantified by Soxhlet (AOAC 2000). Total nitrogen (N) was analyzed according to the Dumas procedure using a LECO Truspec CN equipment (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Protein content was calculated using the factor of 6.25.

Before the mineral composition analyses, representative aliquots of fresh samples of muscle were completely digested by the addition of concentrated HNO₃:HClO₄ (1:4) and by heating to high temperatures (180-220°C) in a sand beaker (Block Digester Selecta S-509; J.P.Selecta, Barcelona, Spain). Fe, Cu, Zn, calcium (Ca) and magnesium (Mg) were analyzed by flame-atomic-absorption spectroscopy in a Perkin-Elmer Analyst 700 Spectrophotometer (Norwalk, CT, USA). Standard solutions were prepared from Tritisol (Merck, Darmstadt, Germany). Total P was determined colorimetrically at 820 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, SC, USA) by the vanadomolibdate procedure (AOAC 2000). To test the accuracy of the mineral analysis, certified external standards (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium) were used, as follows: bovine liver (BCR 185R) for Cu and Zn, lyophilized brown bread (BCR 191) for Fe, skim milk powder (BCR 063R) for Ca, Mg and P. Certified values (mg/kg) were: Cu 277 ± 5, Zn 138.6 ± 2.1, Fe 40.7 ± 2.3, and (mg/g) Ca 13.49 ± 0.10, Mg 1.26 ± 0.02 and P 11.10 ± 0.13. Measured values (mean ± SD of 8 determinations) were: Cu 273 ± 3 mg/kg, Zn 140.0 ± 1.8 mg/kg, Fe 41.5 ± 1.7 mg/kg, Ca 13.47 mg/g, Mg 1.29 ± 0.02 and P 11.04 ± 0.03 mg/g. Previous to Ca determination, 0.3% lanthanum chloride (Merck, Darmstad, Germany) was added to

samples and standards. All glassware and polyethylene sample bottles used for mineral analysis were washed with 10 mM nitric acid. Demineralized water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used throughout the study.

Fatty acid analysis

For the analysis of the FA composition of the muscles, fat was extracted by the method of Folch *et al.* (1957) and the FA were methylated according to Kramer and Zhou (2001), using HCl/methanol for obtaining the fatty acid methyl esters (FAME). Pentadecanoic acid (C15:0; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as internal standard. FAME were identified by gas chromatography using a Focus GC (Thermo Scientific, Milan, Italia) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm capillary silica gel column (TR-CN100 Teknokroma, Barcelona, Spain). A temperature program of 70 °C - 240 °C was used. The injector and detector were maintained at 250 °C. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. Individual FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of standards (47885-U, Sigma Aldrich). Results are expressed as percentage of the total FAME detected.

Instrumental colour measurements

Instrumental colour (CIE L^* , a^* , b^*) was measured in the cross sections of both muscles after a 15-min blooming period using a Minolta Chromameter (CR-400, Konica Minolta Corp., Japan) with illuminant D65 and 0° standard observed. The colourimeter was calibrated before use with white ceramic tile. The value of L is the colour lightness and is often used to distinguish normal from pale or dark meat. Coordinates a and b are termed opponent colour axes; whereas a represents red (positive) versus green (negative) colours, b is positive for yellow colours and negative for blue colours. In addition, the saturation index or chroma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$), which indicates the brightness or vividness of colour, and the hue angle ($H^\circ = \arctg b^*/a^*$), which describes the hue colour, were also calculated. Colour features were obtained as the average of five measurements performed at randomly selected places on each muscle.

Statistical analysis

Within each slaughter BW (50 and 115kg), and for each type of muscle (LT and BF) the results were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA) to study the effects of genotype and dietary protein content and their interaction. As no effect of dietary protein content was found for the FA indexes of muscles, these data were re-analyzed, within slaughter BW, using one-way ANOVA with genotype as the main factor. When interaction was significant, means from each of the four treatment combinations were compared using Fisher's l.s.d test. A probability of 5% or less was accepted as statistically significant. The relationships between the colour coordinates and mineral and FA composition were evaluated by computing the relevant correlation coefficient (Pearson linear correlation). All statistical calculations were carried out using STATGRAPHIC Centurion XVI version 16.1.18 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTS

Nutrient and mineral composition

The nutrient and mineral content of muscles LT and BF from IB and LLW pigs are shown in Tables 1 (50 kg weight) and 2 (115 kg weight). As expected, the IMF content was significantly higher in muscles from IB than LLW pigs, although differences were stronger for LT muscle ($p < 0.001$) at both growing stages. IMF content in IB pigs increased with growth from 6-7 % to 7-11% in LT, and from 3.9-4.5% to 6-6.5% in BF muscles (at 50 and 115 kg weight, respectively), whereas relative stability was observed in both LLW muscles, with values within 3.34-4.70% and 2.6-3.90% for LT and BF, respectively. An effect of dietary protein content on IMF fat was observed in LT muscles at 50 kg weight of both pig types, and in LT of IB pigs at the finishing state, showing that low protein diet led to increased IMF deposition. This effect was not detected in BF muscles or in LLW at 115 kg BW.

No significant effect of genotype or feeding regime was found for the protein content of muscles, except for BF at 50 kg BW, when LLW pigs fed the HP diet had higher muscular protein content (Table 1). The muscular dry matter content had a similar behavior as described for IMF, i.e. muscles of IB pigs had more dry matter than of LLW pigs, at both stages of growth. Ash content in muscles ranged from 1.10% to 1.26 %, and the effect of genotype was only seen at the growing stage (50 kg weight),

when both IB muscles had lower ash values than LLW muscles ($P < 0.01$; Table 1), although these differences disappeared in finishing pigs ($P > 0.05$; Table 2). Significant differences between breeds were observed regarding trace minerals content in both muscles, being the values of Fe and Zn higher in IB than in LLW pigs (differences for Fe at 50 kg weight showed a strong tendency to differ, $P = 0.053$), meanwhile the content of Cu was greater in LLW muscles at 50 kg weight. Fe muscle content increased as dietary protein decreased in finishing pigs. In the growing stage, muscles from IB pigs had lower concentrations of P and similar of Ca and Mg than muscles from LLW pigs; at 115kg weight, IB muscles were also poorer in Mg content.

Table 1

Effects of genotype and dietary protein content on nutrient and mineral composition of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg weight

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype : Diet
LT								
IMF (%)	7.09	6.00	4.72	3.34	0.25	***	*	0.78
Protein (%)	21.4	21.3	21.1	21.4	0.20	0.78	0.73	0.61
Dry matter (%)	27.9	27.2	24.0	24.1	0.22	***	0.56	0.39
Ash (%)	1.13	1.10	1.25	1.21	0.01	**	0.20	0.78
Fe (mg /kg)	17.3	16.0	10.8	9.45	1.47	0.053	0.54	0.84
Cu (mg /kg)	1.16	1.13	3.45	2.46	0.36	*	0.49	0.52
Zn (mg /kg)	17.6	17.3	12.6	11.3	0.62	**	0.54	0.72
Ca (mg /kg)	22.7	20.9	19.0	20.7	0.71	0.20	0.96	0.25
Mg (mg /kg)	278	268	289	289	5.11	0.14	0.64	0.65
P (g /kg)	4.23	4.24	4.76	4.60	0.05	**	0.46	0.40
BF								
IMF (%)	3.88	4.53	3.51	2.65	0.23	*	0.82	0.13
Protein (%)	21.3 ^a	21.0 ^a	19.4 ^b	21.5 ^a	0.16	0.06	*	**
Dry matter (%)	24.9	25.5	23.4	23.3	0.23	**	0.59	0.51
Ash (%)	1.15	1.15	1.26	1.22	0.01	**	0.35	0.33
Fe (mg /kg)	21.8	16.8	13.7	12.3	1.60	0.08	0.21	0.38
Cu (mg /kg)	1.24	1.11	3.15	2.74	0.37	*	0.72	0.85
Zn (mg /kg)	24.0	20.4	16.9	16.8	0.94	*	0.33	0.37
Ca (mg /kg)	21.5	21.9	19.4	18.7	0.74	0.10	0.95	0.70
Mg (mg /kg)	295	287	293	282	4.63	0.73	0.30	0.87
P (g /kg)	4.47	4.43	4.83	4.63	0.05	*	0.27	0.45

LLW= crossbred Landrace × Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17% protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; values in the same row with different superscript differ ($P < 0.05$).

Table 2

Effects of genotype and dietary protein content on nutrient and mineral composition of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype × Diet
LT								
IMF (%)	11.2 ^a	7.02 ^b	3.93 ^c	4.70 ^{bc}	0.48	***	0.09	*
Protein (%)	21.2	22.1	21.8	22.6	0.25	0.28	0.09	0.94
Dry matter (%)	30.7 ^a	27.9 ^b	24.3 ^c	26.4 ^{bc}	0.38	***	0.69	**
Ash (%)	1.09	1.12	1.17	1.12	0.02	0.26	0.89	0.22
Fe (mg/kg)	15.5	8.71	8.00	7.26	0.86	*	*	0.10
Cu (mg/kg)	1.12	1.33	1.71	1.45	0.14	0.23	0.92	0.43
Zn (mg/kg)	19.3	18.7	13.1	13.5	0.27	***	0.92	0.41
Ca (mg/kg)	23.2	22.2	24.8	22.5	1.44	0.75	0.59	0.81
Mg (mg/kg)	248	259	295	292	2.96	***	0.54	0.26
P (g/kg)	4.08	4.16	4.42	4.47	0.04	**	0.43	0.88
BF								
IMF (%)	6.52	6.00	3.21	3.90	0.34	**	0.90	0.39
Protein (%)	21.4	21.9	21.1	21.8	0.23	0.71	0.20	0.77
Dry matter (%)	26.6	25.9	24.3	24.5	0.25	**	0.56	0.40
Ash (%)	1.14	1.16	1.16	1.14	0.01	0.98	0.91	0.56
Fe (mg/kg)	17.5 ^a	9.90 ^b	9.64 ^b	10.2 ^b	0.80	*	*	*
Cu (mg/kg)	1.33	1.56	1.42	1.57	0.12	0.83	0.42	0.88
Zn (mg/kg)	28.6	28.9	17.7	18.1	0.85	***	0.84	0.10
Ca (mg/kg)	19.6	20.9	23.7	21.6	0.78	0.15	0.79	0.29
Mg (mg/kg)	249	253	271	282	4.58	*	0.41	0.71
P (g/kg)	4.19	4.34	4.40	4.42	0.04	0.09	0.33	0.47

LLW= crossbred Landrace × Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17 % protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; values in the same row with different superscript differ ($P < 0.05$).

Fatty acid profile

The FA composition of LT and BF muscles from the two pig genotypes is shown in Table 3 (growing stage) and Table 4 (finishing stage). The calculated indices are presented in Figure 1 (total saturated FA, SFA; total monounsaturated FA, MUFA; total polyunsaturated FA, PUFA) and Figure 2 (ratios PUFA:SFA, MUFA:SFA, n6:n3).

Table 3

Effects of genotype and dietary protein content on the fatty acid composition (% of total FA) of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg BW

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype × Diet
LT								
C14:0	1.84	1.55	0.91	1.13	0.07	**	0.81	0.12
C16:0	27.8	28.3	25.9	27.6	0.61	0.31	0.43	0.66
C16:1 n7	2.46	2.61	2.21	1.99	0.09	*	0.85	0.35
C17:0	0.58	0.60	0.46	0.62	0.03	0.42	0.21	0.33
C17:1 n7	0.51	0.51	0.23	0.23	0.05	*	0.97	0.97
C18:0	14.4	14.5	14.6	18.4	1.11	0.39	0.41	0.43
C18:1 n9	41.3	40.0	39.1	32.8	1.16	0.07	0.14	0.30
C18:1 n7	2.92	3.12	3.25	2.93	0.14	0.83	0.84	0.39
C18:2 n6	6.01	6.42	9.85	10.6	0.56	**	0.64	0.90
C20:0	0.05	0.05	0.08	0.11	0.01	0.10	0.55	0.58
C20:1 n9	0.71	0.70	0.59	0.52	0.02	**	0.28	0.39
C18:3 n3	0.31	0.33	0.48	0.46	0.03	0.06	0.96	0.79
C20:4 n6	0.70	0.88	1.42	1.68	0.09	**	0.26	0.82
C20:5 n3	0.08	0.07	0.12	0.25	0.02	*	0.13	0.07
C22:4 n6	0.15	0.16	0.25	0.34	0.02	**	0.26	0.31
C22:5 n3	0.13	0.16	0.32	0.36	0.02	**	0.41	0.96
C22:6 n3	0.02	0.03	0.17	0.18	0.01	***	0.89	0.91
BF								
C14:0	0.85	0.76	1.08	1.41	0.13	0.12	0.64	0.43
C16:0	27.1	27.38	25.5	23.8	0.30	**	0.28	0.14
C16:1 n7	2.46	2.67	2.03	2.09	0.10	*	0.52	0.73
C17:0	0.75	0.68	0.48	0.70	0.04	0.15	0.37	0.09
C17:1 n7	0.46	0.37	0.21	0.32	0.03	*	0.85	0.14
C18:0	14.1	13.6	14.6	13.0	0.23	0.99	*	0.27
C18:1 n9	39.6	38.9	37.3	34.2	0.71	*	0.22	0.41
C18:1 n7	3.15	3.48	3.10	3.35	0.07	0.56	0.07	0.79
C18:2 n6	8.27	8.62	11.4	15.3	0.67	**	0.15	0.22
C20:0	0.06	0.06	0.09	0.15	0.01	**	0.11	0.11
C20:1 n9	0.67	0.64	0.57	0.52	0.02	*	0.34	0.79
C18:3 n3	0.37	0.34	0.52	0.65	0.02	***	0.29	0.10
C20:4 n6	1.58	1.80	1.94	2.88	0.20	0.09	0.18	0.38
C20:5 n3	0.10	0.12	0.17	0.24	0.01	**	0.11	0.35
C22:4 n6	0.24	0.25	0.32	0.44	0.02	*	0.21	0.24
C22:5 n3	0.24	0.27	0.38	0.58	0.02	**	*	0.12
C22:6 n3	0.05	0.06	0.26	0.31	0.02	***	0.50	0.64

LLW= crossbred Landrace × Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17% protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 4

Effects of genotype and dietary protein content on the fatty acid composition (% of total FA) of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW.

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype × Diet
LT								
C14:0	1.99	2.07	1.74	1.63	0.12	0.19	0.94	0.70
C16:0	27.1	26.7	26.9	27.1	0.70	0.95	0.93	0.86
C16:1 n7	4.54	4.54	3.02	3.02	0.12	***	0.99	0.99
C17:0	0.22	0.48	0.31	0.38	0.05	0.99	0.13	0.37
C17:1 n7	0.19	0.44	0.15	0.28	0.03	0.18	*	0.43
C18:0	11.5	11.0	12.6	13.2	0.35	*	0.93	0.46
C18:1 n9	45.3	43.9	40.8	42.1	0.75	0.06	0.97	0.41
C18:1 n7	3.88	4.70	3.82	3.55	0.17	0.11	0.44	0.15
C18:2 n6	3.60	4.29	7.94	6.58	0.28	***	0.57	0.10
C20: 0	0.08	0.05	0.05	0.05	0.01	0.70	0.53	0.54
C20:1 n9	0.60 ^{ab}	0.59 ^{ab}	0.55 ^b	0.65 ^a	0.01	0.86	0.08	*
C18:3 n3	0.18	0.22	0.35	0.36	0.01	***	0.42	0.62
C20:4 n6	0.56	0.63	1.10	0.75	0.06	*	0.30	0.13
C20:5 n3	0.03 ^b	0.04 ^b	0.09 ^a	0.05 ^b	0.00	**	0.19	*
C22:4 n6	0.10 ^b	0.12 ^b	0.21 ^a	0.14 ^b	0.01	**	0.25	*
C22:5 n3	0.10 ^b	0.13 ^b	0.25 ^a	0.16 ^b	0.01	**	0.29	*
C22:6 n3	0.01	0.02	0.06	0.04	0.00	***	0.17	0.06
BF								
C14:0	1.27	1.10	1.37	1.54	0.12	0.29	0.99	0.50
C16:0	24.0	23.7	24.7	24.7	0.40	0.30	0.84	0.87
C16:1 n7	3.64	4.18	2.71	2.77	0.11	***	0.20	0.29
C17:0	0.37	0.55	0.43	0.46	0.03	0.79	0.12	0.30
C17:1 n7	0.19	0.53	0.21	0.29	0.06	0.41	0.11	0.32
C18:0	10.3	10.0	12.2	11.8	0.25	**	0.56	0.90
C18:1 n9	44.9	45.1	38.7	40.1	0.56	***	0.49	0.61
C18:1 n7	3.91	4.70	3.90	3.90	0.14	0.17	0.18	0.18
C18:2 n6	8.19	7.21	11.5	10.4	0.29	***	0.10	0.91
C20: 0	0.08	0.05	0.05	0.05	0.01	0.70	0.53	0.54
C20:1 n9	0.27	0.10	0.57	0.65	0.05	***	0.65	0.22
C18:3 n3	0.18	0.22	0.35	0.36	0.01	***	0.42	0.62
C20:4 n6	1.79	1.50	2.25	2.05	0.07	**	0.13	0.77
C20:5 n3	0.09	0.08	0.14	0.13	0.00	***	0.20	0.67
C22:4 n6	0.25	0.23	0.33	0.29	0.01	**	0.21	0.68
C22:5 n3	0.25	0.23	0.37	0.33	0.01	***	0.18	0.51
C22:6 n3	0.06	0.05	0.09	0.10	0.01	*	0.90	0.60

LW= crossbred Landrace × Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17 % protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; values in the same row with different superscript differ ($P < 0.05$).

Pig genotype significantly affected the FA profile of both muscles. At 50 kg weight (Table 3), slight differences were detected in total SFA, but IB muscles had higher content of total MUFA ($P = 0.06$ in LT; $P = 0.01$ in BF) and lower content of total PUFA ($P < 0.01$) than those of LLW pigs (Figure 1). Higher values of MUFA were mainly related to higher contents of oleic acid in the IB breed ($P = 0.07$ in LT; $P = 0.03$ in BF), whereas lower PUFA content were due to smaller proportions of C 18:2n6 and FA from the n3 series. Then, ratio PUFA:SFA was lower for IB muscles, which in turn showed significantly higher n6:n3 ratios than LLW pigs (Figure 2).

At 115 kg weight (Table 4), muscles of IB pigs contained higher percentages of C 16:1 and oleic acid ($P = 0.06$ in LT, $P = 0.03$ in BF), and smaller proportions of C 18:0, C 18:2n6, C 18:3n3, C 20:4n6, C 20:5n3 and C 22 FA than those of LLW pigs. Loins of IB pigs at the finishing stage were richer in MUFA and poorer in PUFA content than those from LLW pigs, and BF muscles had also lower contents of total SFA (Fig. 1). The PUFA:SFA ratio was higher in both muscles from LLW pigs at 115 kg weight, whereas significant differences on MUFA:SFA and n6:n3 ratios were only observed for BF muscle (Fig. 2).

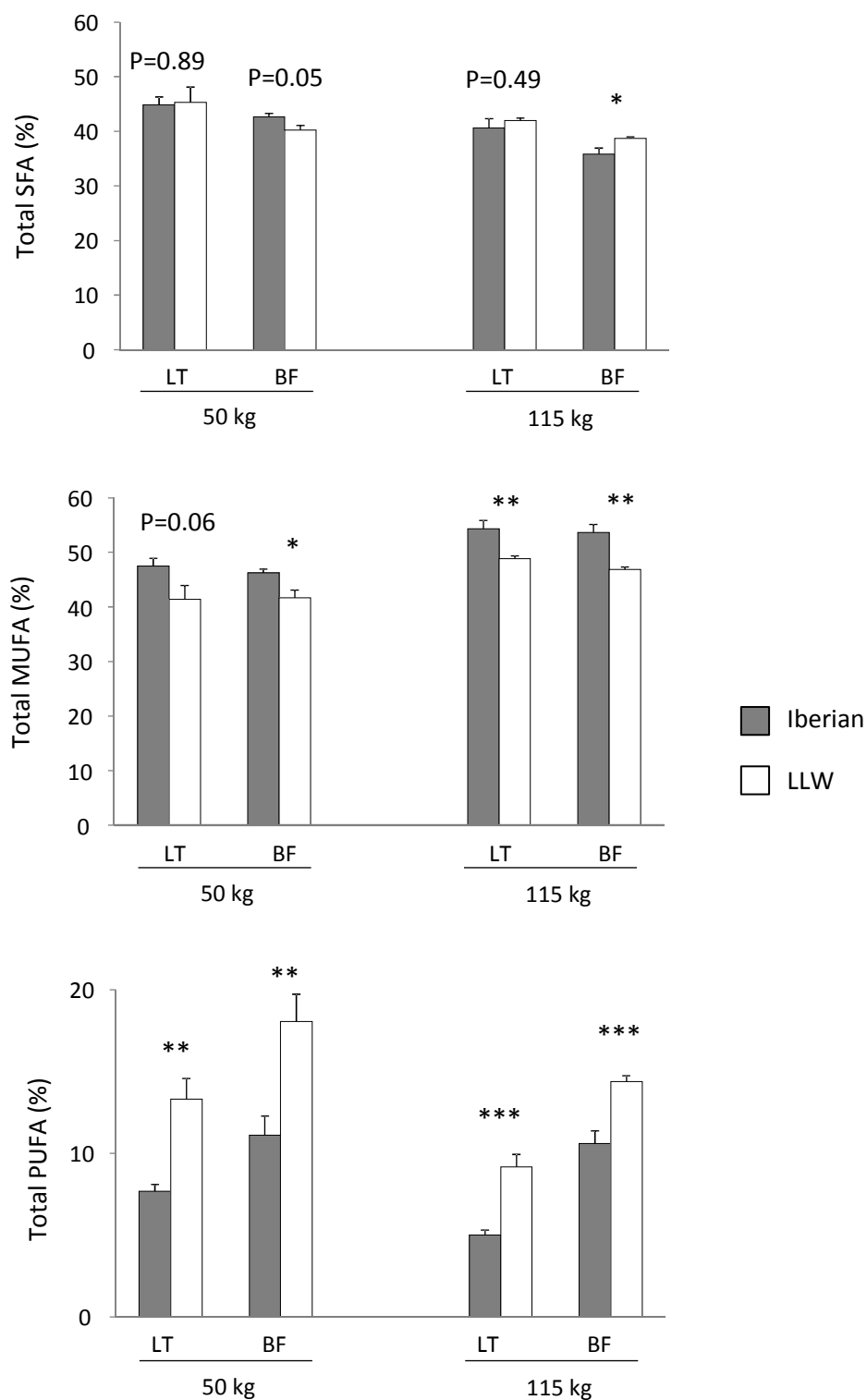


Figure 1. Effect of genotype on FA indexes of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg and 115 kg of weight.

LLW= Crossbred Landrace × Large White pigs; SFA= saturated fatty acids; MUFA= monounsaturated fatty acids; PUFA= polyunsaturated fatty acids; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

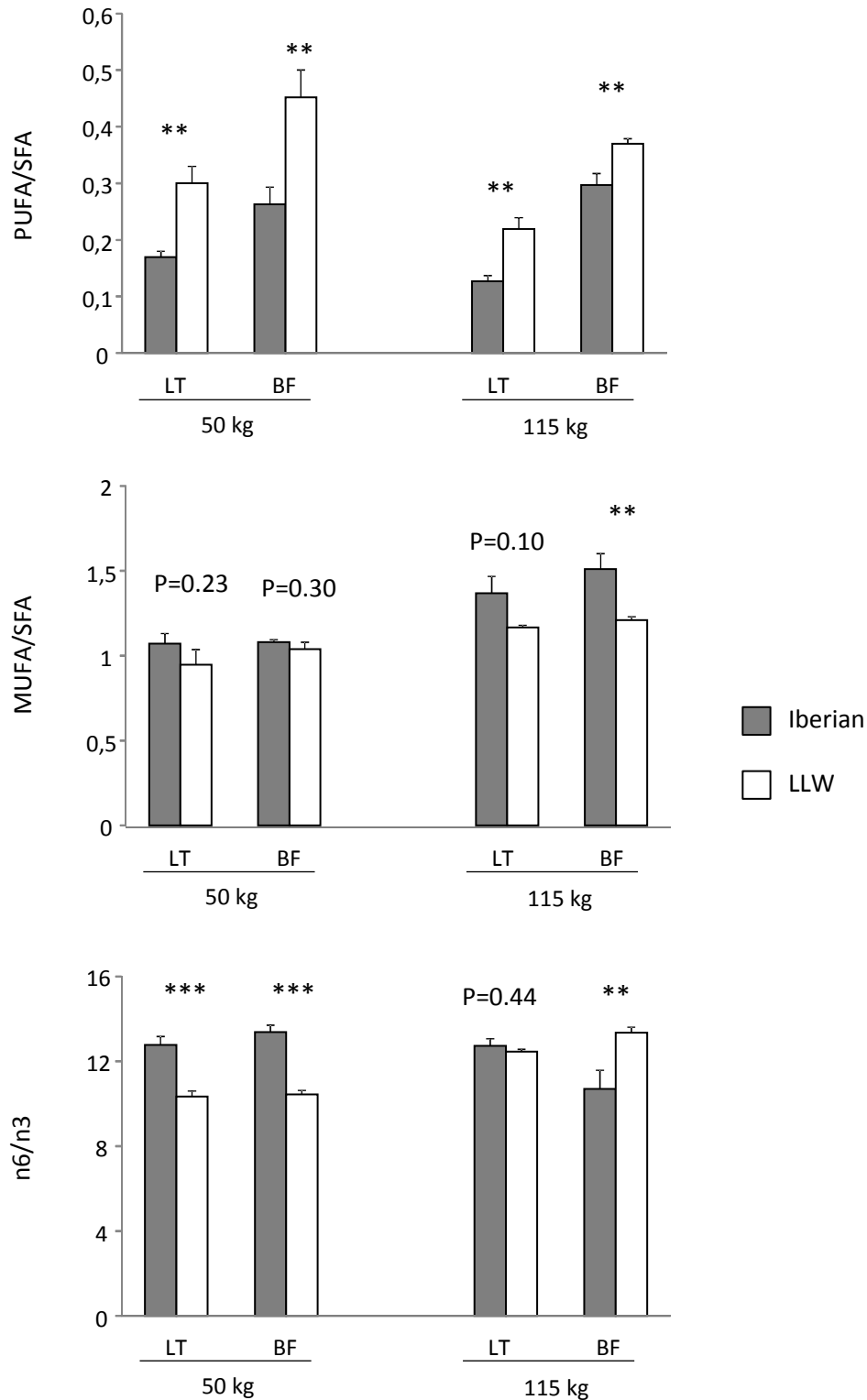


Figure 2. Effect of genotype on FA ratios of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg and 115 kg of weight.

LLW= Crossbred Landrace × Large White pigs; SFA= saturated fatty acids; MUFA= monounsaturated fatty acids; PUFA= polyunsaturated fatty acids; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Colour coordinates

The colour coordinates (L^* , a^* and b^*) and the calculated Chroma and hue angle values for LT and BF muscles of the two genotypes are shown in Tables 5 (at 50 kg BW) and 6 (at 115 kg BW). It can be observed that instrumental colour of LT and BF muscle differ, but in both of them, colour was significantly affected by genotype.

At the growing stage, lightness of muscles (L^*) did not show differences due to genotype, but at the finishing weight, LT and BF from IB pigs were darker (lower L^*) than those from LLW animals, which were paler. Meat from IB pigs showed higher values of redness (a^*) and lower of yellowness (b^*) than muscles from the lean breed, although differences in some minor cases did not reach statistical significance. Slight differences were observed for the chroma value, but muscles of IB pigs had significantly lower hue angle values, which mean a colour closer to the true red axis. No main differences were observed due to dietary protein level and only some interactions genotype \times diet were shown at the growing stage.

Table 5

Effects of genotype and dietary protein content on instrumental colour parameters of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 50 kg BW.

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype \times Diet
LT								
L^*	40.9 ^b	47.5 ^a	46.2 ^{ab}	40.4 ^b	0.98	0.64	0.87	**
a^*	11.7	10.4	8.91	7.20	0.62	*	0.25	0.88
b^*	5.54 ^c	8.77 ^b	13.3 ^a	9.45 ^b	0.42	***	0.70	**
Chroma	12.9 ^b	13.9 ^{ab}	16.1 ^a	12.1 ^b	0.46	0.48	0.13	*
Hue angle	25.4	41.3	56.2	52.7	2.65	**	0.25	0.08
BF								
L^*	38.7	43.1	43.4	39.9	0.77	0.63	0.78	*
a^*	13.2	13.0	10.3	11.9	0.36	*	0.33	0.26
b^*	4.95	6.44	10.6	9.87	0.79	*	0.82	0.49
Chroma	14.2	14.7	14.9	15.7	0.63	0.50	0.61	0.91
Hue angle	20.3	25.8	45.4	38.4	2.49	**	0.88	0.23

LLW= crossbred Landrace \times Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17% protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; values in the same row with different superscript differ ($P < 0.05$).

Table 6

Effects of genotype and dietary protein content on instrumental colour parameters of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles of pigs slaughtered at 115 kg BW.

	Iberian		LLW		SEM	P-value		
	LP	HP	LP	HP		Genotype	Diet	Genotype × Diet
LT								
<i>L</i> *	42.3	39.4	44.2	45.1	0.68	*	0.50	0.18
<i>a</i> *	10.3	10.1	9.86	9.77	0.26	0.45	0.74	0.87
<i>b</i> *	5.81	4.71	7.03	8.20	0.30	**	0.96	0.08
Chroma	11.6	11.1	12.2	13.4	0.30	*	0.49	0.15
Hue angle	29.2	24.9	35.5	39.9	1.53	**	0.98	0.15
BF								
<i>L</i> *	37.4	36.1	40.2	40.1	0.69	*	0.65	0.67
<i>a</i> *	15.6	14.8	12.7	13.6	0.48	*	0.99	0.39
<i>b</i> *	4.88	3.72	5.11	5.52	0.33	0.15	0.59	0.26
Chroma	16.4	15.2	13.8	14.7	0.53	0.14	0.90	0.32
Hue angle	17.3	14.2	22.4	22.0	1.41	*	0.50	0.60

LLW= crossbred Landrace × Large White pigs; LP= low-protein diet (13% protein); HP= high-protein diet (17% protein); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

Nutrient and mineral composition

The IB pig is a slow-growing Mediterranean breed with higher whole-body fat content than lean pigs (Nieto *et al.* 2002; Barea *et al.* 2007) and whose products are considered of high quality mainly due to their high IMF and oleic acid content compared with conventional breeds (Serra *et al.* 1998). The IMF content is important for meat quality traits, as it may improve the juiciness and tenderness sensation (Lawrie 1998) and, therefore, the acceptability of the final product. Thus, the present findings related with fat content and composition of IB pigs support previous knowledge, but also show, for the first time, that IB genotype maintains its particular high IMF compared with lean pigs even under identical nutritional management. In this line, the high level of IMF in meat from IB pigs has been attributed to a genetic ability to synthesize and store large amounts of lipids in tissues (González *et al.* 2012). Ventanas *et al.* (2006) have observed IMF values of 4.19 % for BF muscles in IB pigs of 160-170 kg BW, similar than those found in the present study, and lower values, around 2.4%, when IB were crossed with lean genotypes (Duroc). IMF content of BF is even lesser (1.9-2.2%) in lean breed pigs (Lebret *et al.* 2011). The IMF found in LT

muscles from IB × Duroc pigs (3.5-5.9%) (Ramirez and Cava 2007) is also lower than that observed in the present assay for pure IB.

According to our results, dietary protein level influenced IMF content of LT muscles of both pig types at the growing stage and of IB finishing pigs. No effect on IMF of BF muscle was detected. Therefore, the present data partly agree with previous reports indicating that at low levels of dietary protein relative to requirements IMF tend to increase (Canh *et al.* 1998). Lambe *et al.* (2013) have shown that lean pigs fed from 40 to 115 kg BW a low essential amino acids regime have significantly more fat (including intramuscular depots) than those fed a high essential amino acids diet, but only from 85 kg onwards.

Mineral composition of porcine muscles receives usually little attention by producers, with the possible exception of Fe. However, pig meat may be a valuable source of minerals in the human diet (such as Fe, and Zn) (Reig *et al.* 2013). As commented, differences in total ash content of muscles between IB and lean pigs were observed at 50 kg weight, but not at the finishing phase. However, some breed differences were detected concerning mineral content, particularly related with trace minerals and also with P levels. Thus, at BW close to the usual slaughter weight, loins and hams of IB pigs are a better source of Fe and Zn than muscles from lean pigs. In the present study, values of Fe content up to 21.8 mg/kg were found in IB pigs, whereas muscles from lean pigs did not surpassed 13.7 mg Fe/kg, supporting that meat from Iberian pigs have significantly higher amounts of Fe than meat from other breeds, including crossed IB pigs (with average Fe content in BF of 9-10 mg/kg), due to greater contents of heme pigments such as myoglobin (Ventanas *et al.* 2006). The content of pigments is affected by muscle physiology and it is known that oxidative fibres have higher content of heme pigments than glycolytic ones. It has been described that the proportion of type I fibres, of predominant oxidative metabolism, is larger and their diameter greater in muscles of IB pigs compared with lean breeds (Serra *et al.* 1998). Thus, higher Fe content found in IB muscles in the present assay may be related to more oxidative muscle metabolism in this breed. Although lower content of Mg and P were found in the IB muscles, it is accepted that pork meat is a good source of dietary Fe and Zn in humans, but it is not an important source for the contribution of dietary Ca, Mg and P (Reig *et al.* 2013). Wiseman and Mahan (2010) have shown that high-lean genetic line pigs have greater total macro and micro minerals contents in the ham and loin than low-lean pigs, but when expressed on a

per kg basis, the composition is similar for both genetic lines and, therefore, differences could be attributed to the greater development of muscle tissue in high-lean pigs. In this line, our research group has previously shown that the most relevant differences with respect to lean and conventional pig breeds are focused on the comparatively smaller relative size of lean tissues in the IB pigs, their rates of growth, and the increased total body fat with marked changes in its distribution among depots (Nieto *et al.* 2013). Additionally, according to the results of the current assay, they also have different mineral concentrations.

Fatty acid profile

Although it has been shown that the protein level of the diet may influence the FA composition in meat of lean pigs (Martinez-Aispuro *et al.* 2012), we have found only minor effects of the diet in the FA profile of muscles, and none in the global indexes.

It is known that one of the main characteristics of IB pig muscles is a large proportion of oleic acid (C 18:1n9) (Cava *et al.* 2000). The MUFA content found in the present assay in IB pig muscles (nearly 55% of total FA at 115 kg weight) is in general agreement with previous data (Ventanas *et al.* 2006; Tejerina *et al.* 2012). Lower values of SFA and higher of PUFA than those observed in the present experiment have been found in LT muscles of IB pigs reared outdoors and slaughtered at 150 kg (SFA 33.2-34.2% vs 40.6%, PUFA 8.8-9.5% versus 5.01%) (Muriel *et al.* 2004). The production system has a clear effect on FA composition of muscles, and it has been shown that muscles from pigs fattened in *Montanera* (special sylvo-pastoral system based on acorns) have significantly higher amounts of oleic acid (more than 50%) than pigs raised under intensive management (Tejerina *et al.* 2012), which show similar values than those observed in the present assay.

Differences in FA profiles between genotypes could be attributed to differences in IMF content or to a different potential for endogenous FA synthesis (Ramirez and Cava 2007). The high content of IMF observed in IB muscles could cause a dilution effect of phospholipids, leading to lower values of total PUFA, which agrees with previous observations in high-fat porcine breeds (Suzuki *et al.* 2003) and in different lines of IB pigs differing in the IMF content (Muriel *et al.* 2004). In addition to the dilution effect, other factors could contribute to differences in FA profile between

genotypes, such as the capacity of accumulation or storage of fat (Ramirez and Cava 2007; Barea et al. 2013) and FA mobilization via β -oxidation (Kloareg et al., 2007).

The observed differences in FA profile of pig muscles due to genotype may have important repercussions on meat value as, beside fat quantity, it determines sensorial, technological and nutritional aspects, influencing consumer acceptability (Webb and O'Neill 2008). It is known that the high sensory quality of IB products is related to their high oleic acid content (Serra *et al.* 1998). In addition, high proportions of PUFA reduce the oxidative stability of lipids, which could negatively influence the sensory characteristics of the meat and increase the risk of rancidity (Nawar 1996).

Colour coordinates

Instrumental colour has been widely used to evaluate quality in porcine meat. With this purpose, colour coordinates of muscles have been determined in different lines of IB genotype (Muriel *et al.* 2004), in IB pigs under different production systems (González *et al.* 2011; Tejerina *et al.* 2012) in crossed IB breeds (Carrapiso and García 2005; Ventanas *et al.* 2006; Ramirez and Cava 2007) and also in meat from conventional porcine breeds (Heyer and Lebret 2007; Lebret *et al.* 2011; Needham and Hoffman 2015). However, comparisons about meat colour between pure IB and lean pigs under the same nutritional management have not been reported to the best of our knowledge.

Results of the present assay show that IB muscles were darker and reddish than muscles from lean pigs; these differences are valuable for the IB genotype, as such characteristics make meat more attractive for producers and consumers (Straadt *et al.* 2013). In agreement with the lack of effect found for dietary protein level in meat colour, other researchers have shown that feeding pigs diets containing different protein content do not have a large influence on meat colour and that the effect is considered negligible when evaluated by the consumer (Needham and Hoffman 2015). Similar colour differences to those found in the current assay between IB and LLW pigs have been shown between pure IB and crossbred pigs, as muscles from pure IB pigs are darker and redder than muscles from crossbred animals (Ventanas *et al.* 2006). It has also been described that the different metabolic pattern of muscles affects the instrumental colour, both in IB (Tejerina *et al.* 2012; Ramírez and Cava

2007) and in lean pigs (Lebret *et al.* 2011). Accordingly, our findings show that LT muscles were on average paler (higher L^*) and less red (a^*) compared with BF muscles, which have a higher content of oxidative fibres (Ramírez and Cava 2007).

The red colour in muscles is attributed to the presence of heme pigments and the Fe content (Muriel *et al.* 2004), and lightness has been related to the FA composition, as higher PUFA content may make the fat more fluid and leads to increase the reflection of light from the meat surface, thus increasing L^* value (Ventanas *et al.* 2006). In the current work, global relationships of colour parameters of muscles with mineral content, muscle composition and FA profile were examined. Main correlations are shown in Table 7.

Correlations between redness and Fe content were only found in LT muscles, whereas strong relationships of a^* with Zn content ($p < 0.001$) were observed in both muscles. In BF, moreover, redness intensity was negatively related with Mg and P contents. Yellowness (b^*) correlated negatively with Zn ($p < 0.01$) and positively with Cu content ($p < 0.05$) in both muscles; relationships between Zn and L^* were found in BF. Chroma and hue values were also significantly affected by Cu and Zn muscle content, and hue angle was also related with P content. This together indicates that minerals other than Fe (particularly Zn) may influence colour parameters, and consequently the overall quality of porcine meat, and that muscles differing in fiber metabolism (oxidative or glycolytic) have different relationships between minerals and colour.

It has been stated that lightness depends, among other factors, on fat content and FA composition of meat (Andrés *et al.* 2000). However, in the current study, no relationships were found between L^* and IMF of muscles, although IMF was positively related with redness (a^*) and brightness (chroma) in BF. Furthermore, in this muscle a^* value was positively linked to MUFA content and negatively related to SFA and PUFA levels. In the LT muscle, only the correlation between a^* and PUFA was found. Therefore, in the BF muscle, measurement of the redness colour could be a good indicator of the content of total fat and MUFA, both valuable traits of the Iberian pig meat. Yellowness was negatively correlated with MUFA and positively with PUFA contents, i.e., the opposite behavior than that found for a^* coordinate. Regression analysis of the relative importance of each fatty acid on fat characteristics of pigs have identified the linoleic acid as the FA that best explain the variation in yellow

colouration (Maw *et al.* 2003), which is in agreement with the relationship found in the present trial between C18:2 n6 and b^* coordinate.

Table 7

Pearson's correlation coefficient (r) between instrumental colour parameters and mineral and fatty acid composition of *longissimus thoracis* (LT) and *biceps femoris* (BF) muscles.

	L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue angle
LT					
Fe	-0.194	0.506**	-0.052	0.315	-0.188
Cu	-0.005	0.017	0.367*	0.384*	0.225
Zn	-0.198	0.602***	-0.537**	-0.072	-0.619***
Ca	-0.240	0.279	-0.261	0.033	-0.335
Mg	-0.003	-0.102	0.190	0.158	0.140
P	-0.045	-0.158	0.506**	0.399*	0.396*
IMF	-0.002	0.292	-0.344	-0.159	-0.353*
SFA	0.001	0.201	0.026	0.204	-0.035
MUFA	-0.005	0.166	-0.397*	-0.353	-0.372*
PUFA	0.007	-0.565**	0.655***	0.333	0.695***
C18:2 n6	0.011	-0.533**	0.656***	0.359	0.682***
BF					
Fe	-0.116	0.049	-0.071	0.087	-0.130
Cu	0.037	-0.239	0.353*	0.092	0.393*
Zn	-0.574***	0.667***	-0.434*	0.295	-0.554***
Ca	0.209	0.151	-0.140	0.002	-0.143
Mg	0.235	-0.504**	0.185	-0.324	0.302
P	0.165	-0.567***	0.447*	-0.133	0.526**
IMF	-0.186	0.597***	-0.243	0.373*	-0.363*
SFA	0.343	-0.418*	0.229	-0.194	0.303
MUFA	-0.278	0.635***	-0.576**	0.098	-0.656***
PUFA	0.080	-0.469*	0.542**	0.029	0.584***
C18:2 n6	0.101	-0.497**	0.562**	0.017	0.610***

IMF= Intramuscular fat; SFA= saturated fatty acids; MUFA= monounsaturated fatty acids; PUFA= polyunsaturated fatty acids; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

As FA are colourless, it has been proposed that correlation between yellow colour and linoleic acid (which must come from diet) may be due to an increase in the concentration of the pigments associated with foods containing these FA (Maw *et al.* 2003). However, this hypothesis cannot be applied in the present experiment, since the nutritional treatment was the same for all animals. Although the link between FA composition and a^* and b^* coordinates cannot be explained by this study, it may be

stated that differences in FA profile from IB and lean genotypes could have important consequences in colour characteristics of raw meat.

CONCLUSIONS

This study provides new data on the comparisons of meat characteristics between pig genotypes, using the pure Iberian pig and a Landrace × Large White pig as models, subjected to identical production system. Although different results were observed depending on the muscle type and the slaughter BW of pigs, a wide effect of genotype was shown for IMF, mineral composition, FA profile and colour characteristics of the meat. Significant relationships of colour coordinates with mineral content and FA composition of muscles were found; redness was mainly linked to Fe, Zn and MUFA levels, whereas yellowness was positively related with Cu and PUFA and linoleic acid levels. With some exceptions, the protein content of the diet did not have a large influence on the quality traits evaluated. The results of the present study support that muscles from the IB pig genotype have special characteristics, which may enhance the overall quality of meat compared with conventional or high-lean porcine breeds, even under identical management system, due to its particular fat composition and colour attributes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project AGL2011-25360. We acknowledge Sánchez Romero Carvajal Jabugo SA (Cádiz, Spain) and Jodral Gutierrez SA (Córdoba, Spain) for helpful collaboration. The assays described are part of the doctoral thesis of Patricia Palma Granados, under the Doctoral Program of the University of Granada.

REFERENCES

- Andrés AI, Ruiz J, Mayoral AI, Tejeda JF, Cava R (2000) Influencing of rearing conditions and crossbreeding on muscle colour in Iberian pigs. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie* **6**, 315–321.
- AOAC (2000) “Official methods of analysis”, 17th edn. (Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC).

- Barea R, Nieto R, Aguilera JF (2007) Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal* **1**, 357–365. doi:10.1017/S1751731107666099
- Barea R, Nieto R, Vitari F, Domeneghini C, Aguilera JF (2011) Effects of pig genotype (Iberian vs. Landrace × Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal* **5**, 547–557. doi:10.1017/S1751731110002181
- Barea R, Isabel B, Nieto R, López-Bote C, Aguilera JF (2013) Evolution of the FA profile of subcutaneous adipose tissue in IB and Landrace×Large White pigs at growing and fattening stages. *Animal* **7**, 688-698. doi:10.1017/S175173111200184X
- BSAS (2003) “Nutrient Requirement Standards for Pigs”. (British Society of Animal Science: Penicuik, UK)
- Cameron ND, Enser M, Nute GR, Whittington FM, Penman JC, Fisker AC, Perry AM, Wood JD (2000) Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science* **55**, 187-195. doi:10.1016/S0309-1740(99)00142-4
- Canh TT, Aarnink AJA, Schutte JB, Sutton A, Langhout DJ, Verstegen MWA (1998) Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing-finishing pigs. *Livestock Production Science* **56**, 181–191. doi:10.1016/S0301-6226(98)00156-0
- Carrapiso AI, Garcia C (2005) Instrumental colour of Iberian ham subcutaneous fat and lean (biceps femoris): Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science* **71**, 284-290.
- Cava R, Ventanas J, Tejada JF, Ruiz J, Antequera T (2000) Effect of free-range rearing and α -tocopherol and copper supplementation on fatty acid profiles and susceptibility to lipid oxidation of fresh meat from Iberian pigs. *Food Chemistry* **68**, 51-59. doi:10.1016/S0308-8146(99)00155-7
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Fuentes V, Ventanas S, Ventanas J, Estévez M (2014) The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: purebred Iberian versus reciprocal Iberian × Duroc crossbred pigs. *Meat Science* **96**, 737-743. doi:10.1016/j.meatsci.2013.10.010
- González E, Hernández-Matamoros A, Tejada JF (2012) Two by-products of the olive oil extraction industry as oleic acid supplement source for Iberian pigs: effect on the meat's chemical composition and induced lipoperoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**, 2543-2551. doi:10.1002/jsfa.5669

- Heyer A, Lebret B (2007) Compensatory growth response in pigs: effects on growth performance, composition of weight gain at carcass and muscle levels, and meat quality. *Journal of Animal Science* **85**, 769-78. doi:10.2527/jas.2006-164
- Kloareg M, Noblet J, van Milgen J (2007) Deposition of dietary fatty acids, de novo synthesis and anatomical partitioning of fatty acids in finishing pigs. *British journal of Nutrition* **97**, 35-44. doi:10.1017/S0007114507205793
- Kramer JKG, Zhou J (2001) Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**, 594-600. doi:10.1002/1438-9312(200109)103:9<594::AID-EJLT5942>3.0.CO;2-R
- Lambe NR, Wood JD, McLean KA, Walling GA, Whitney H, Jagger S, Fullarton P, Bayntun J, Bünger L (2013) Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype 2. Compositional traits measured with computed tomography (CT). *Meat Science* **95**, 129-136. doi:10.1016/j.meatsci.2013.04.038
- Lawrie RA (1998) The eating quality of meat. In "Meat Science" 6th edn. pp. 212–257. (Woodhead Publishing: Cambridge)
- Lebret B, Prunier A, Bonhomme N, Foury A, Mormède P, Dourmad JY (2011) Physiological traits and meat quality of pigs as affected by genotype and housing system. *Meat Science* **88**, 14-22. doi:10.1016/j.meatsci.2010.11.025
- Martínez-Aispuro M, Figueroa-Velasco JL, Zamora-Zamora V, Sánchez-Torres MT, Ortega-Cerrilla ME, Cordero-Mora JL, Ruiz-Flores A, González-Muñoz SS (2012) Effect of fatty acids source on growth performance, carcass characteristics, plasma urea nitrogen concentration, and fatty acid profile in meat of pigs fed standard- or low-protein diets. *Spanish Journal of Agriculture Research* **10**, 993-1004. doi:10.5424/sjar/2012104-323-11
- Maw SJ, Fowler VR, Hamilton M, Petchey AM (2003) Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. *Meat Science* **63**, 185-190. doi:10.1016/S0309-1740(02)00069-4
- Muriel ME, Ruiz J, Ventanas J, Petrón MJ, Antequera T (2004) Meat quality characteristics in different lines of Iberian pigs. *Meat Science* **67**, 299-307. doi:10.1016/j.meatsci.2003.11.002
- Nawar WW (1996) Lipids. In "Food Chemistry". (Ed. OR Fennema) pp. 225–319. (Marcel Dekker: New York)
- Needham T, Hoffman L C (2015) Physical meat quality and chemical composition of the Longissimus thoracis of entire and immunocastrated pigs fed varying dietary protein levels with and without ractopamine hydrochloride. *Meat Science* **110**, 101-108. doi:10.1016/j.meatsci.2015.06.017

- Nieto R, Miranda A, García MA, Aguilera JF (2002) The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition* **88**, 39–49. doi:10.1079/BJN2002591
- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Aguinaga MA, Conde-Aguilera JA, Aguilera JF (2012) Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science* **90**, 3809–3820. doi:10.2527/jas.2011-5027
- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Conde-Aguilera JA, Aguilera JF (2013) Growth of body components and carcass composition of Iberian pigs of 10 to 150 kg body weight as affected by the level of feeding and dietary protein concentration. *Journal of Animal Science* **91**, 4197–4207. doi:10.2527/jas.2013-6332
- Pereira PM, Vicente AF (2013) Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* **93**, 586–592.
- Ramirez R, Cava R (2007) Carcass composition and meat quality of three different IberianxDuroc genotype pigs. *Meat Science* **75**, 388–396. doi:10.1016/j.meatsci.2006.08.003
- Reig M, Aristoy MC, Toldrá F (2013) Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry* **140**, 478–482. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.085
- Serra X, Gil F, Pérez-Enciso M, Oliver MA, Vázquez JM, Gispert M, Díaz I, Moreno F, Latorre R, Noguera JL (1998) A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyrbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science* **56**, 215–223. doi:10.1016/S0301-6226(98)00151-1
- Straadt IK, Aaslyng MD, Bertram HC (2013) Sensory and consumer evaluation of pork loins from crossbreeds between Danish Landrace, Yorkshire, Duroc, Iberian and Mangalitzta. *Meat Science* **95**, 27–35. doi:10.1016/j.meatsci.2013.04.026
- Suzuki K, Shibata T, Kadowaki H, Abe H, Toyoshima T (2003) Meat quality comparison of Berkshire, duroc and crossbred pigs sired by Berkshire and duroc. *Meat Science* **64**, 35–42. doi:10.1016/S0309-1740(02)00134-1
- Tejerina D, García-Torres S, Cabeza de Vaca M, Vázquez FM, Cava R (2012) Effect of production system on physical–chemical, antioxidant and fatty acids composition of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from Iberian pig. *Food Chemistry* **133**, 293–299. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.025
- Teye GA, Sheard PR, Whittington FM, Nute GR, Stewart A, Wood JD (2006) Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Science* **73**, 157–165. doi:10.1016/j.meatsci.2005.11.010

- Ventanas S, Ventanas J, Jurado A, Estévez M (2006) Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs. *Meat Science* **73**, 651-659. doi:10.1016/j.meatsci.2006.03.009
- Webb EC, O'Neill HA (2008) The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science* **80**, 28-36. doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.029
- Wiseman TG, Mahan DC (2010) Partition of minerals in body components from a high- and low-lean genetic line of barrows and gilts from 20 to 125 kilograms of body weight. *Journal of Animal Science* **88**, 3337-3350. doi:10.2527/jas.2010-2830

Genotype and lysine deficiency affect amino acid composition of growing pigs

Patricia Palma-Granados, Luis Lara, Isabel Seiquer, José F. Aguilera and Rosa Nieto

Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

En evaluación

ABSTRACT

The objective of the present work was to investigate the effects of genotype and dietary lysine deficiency on amino acid (AA) composition of carcass and muscles of Iberian and Landrace × Large White (LDW) pigs, reared in similar experimental conditions. Twenty eight barrows, 14 from each breed, were randomly assigned to 2 experimental diets according to a factorial arrangement of treatments (2 breeds × 2 diets). Diets were isonitrogenous and isoenergetic (200 g CP/kg DM; 14 MJ ME/kg DM) and with identical chemical composition except for the lysine content (10.9 and 5.20 g lysine/kg DM, for lysine-adequate (AL) diet and lysine-deficient (DL) diet, respectively). Pigs were individually housed, and daily feed allowance was adjusted on a weekly basis according to body weight. The experiment started at 10 kg BW and ended at 25 kg BW. Concentration of isoleucine, valine, and phenylalanine were higher in carcass protein of Iberian pigs compared to LDW pigs (5 to 9%; $P < 0.01$), and those of threonine and methionine tended to be lower in the former ($P = 0.06$). Dietary lysine restriction reduced histidine concentration only in the carcass of Iberian pigs (13%); while lysine carcass concentration decreased (13%) in LDW pigs but not in Iberian pigs ($P < 0.05$); and leucine concentration decreased in carcass protein of both pig types (6 to 10%, $P < 0.001$). For *longissimus dorsi* muscle, higher concentration of arginine, isoleucine, phenylalanine, lysine and valine (4.6 to 7.5%; $P < 0.001$ to $P < 0.05$), and lower of methionine (7.2%; $P < 0.001$) were observed in muscle protein of Iberian pigs; whereas when both pig types were fed DL diet, the concentration of phenylalanine, leucine, lysine, threonine and methionine decreased and that of arginine increased ($P < 0.001$ to $P < 0.05$). In contrast, genotype and lysine deficiency effects were rather moderate in the AA composition of protein of *biceps femoris* muscle. Concentration of arginine was higher and histidine lower in Iberian pigs ($P < 0.01$) and no modifications in dispensable AA concentrations related to dietary lysine deficiency were observed. The results show that AA proportions in protein of whole carcass and *longissimus dorsi* can be influenced by pig genotype and modulated in conditions of lysine shortage, meanwhile a muscle with different functional and metabolic properties, as *biceps femoris*, shows a more constant AA composition which seem to prevail independent from genotype or nutritional challenges.

Keywords: amino acid composition, pig genotype, lysine deficiency, muscle protein, carcass protein

IMPLICATIONS

The differences in amino acid (AA) composition of carcass and muscle protein detected in this study, in which fatty and lean pigs have been assessed, deserve further investigation and might have consequences for definition of an optimum pattern of dietary AA for Iberian growing pigs, improving their performance and efficiency of dietary protein utilization. Additionally, it seems that fatty and lean pigs responded in general terms in a similar way to a dietary lysine deficiency, by modifying the rate of body and muscle growth, and modulating the protein composition of specific muscles, a fact probably related with their metabolic and physiologic functions.

INTRODUCTION

The Iberian pig is an autochthonous pig breed from the Southwest of Spain characterized by slower growth, higher fat deposition, and less protein content than conventional pig types (Nieto *et al.*, 2012). In previous studies we showed, at different stages of the productive cycle, that total protein requirements for Iberian pigs are lower compared to those for leaner pigs (Nieto *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2007; Garcia-Valverde *et al.*, 2008; Conde-Aguilera *et al.*, 2011). In all these studies dietary protein was formulated following the optimum AA pattern -in terms of g AA/kg CP- established for conventional pigs (BSAS, 2003; NRC, 1998).

It is generally assumed that the AA composition of body protein is constant. Nevertheless, in pigs there are some evidences that AA composition of body proteins may be affected by different factors such as protein and energy intake (Bikker *et al.*, 1994), body weight (Mahan and Shields, 1998) and essential AA supply (Conde-Aguilera *et al.*, 2010; 2014). Such changes in the body AA pattern have been related to alterations in the relative proportions of body proteins (actin, myosin, collagen, etc.) which have different AA proportions (Chung and Baker, 1992). In addition, deficiencies in indispensable AA supply have been associated to changes in muscle AA composition and metabolic properties (Katsumata *et al.*, 2008; Conde-Aguilera *et al.*, 2016). It is also possible that pigs with marked differences in body composition, like those found among fatty and lean pig genotypes, could differ in AA composition of body proteins. Thus, it remains questionable using the dietary AA pattern established for conventional pigs for feeding slow-growing, fatty pigs. In this sense, in a study

designed with Iberian piglets to determine the proportion of lysine in dietary protein for optimal growth and carcass protein deposition, it was observed that the higher rates of carcass protein retention were obtained with a ratio of 64 g lysine/kg protein (Nieto *et al.*, 2015), approximately 14% lower than that recommended for conventional piglets (NRC, 2012).

With this background, the objective of this study was to assess the AA composition of carcass and muscle protein of Iberian and Landrace × Large White (LDW) piglets fed either a lysine-adequate (AL) or a lysine-deficient (DL) diet, both of similar total protein content. Plasma free AA concentrations were also tested for differences among genotypes and dietary treatments in similar experimental conditions. We hypothesized that these genotypes have a different AA profile of body protein and also that they respond differently in terms of AA body pattern to cope with restricted lysine supply.

MATERIALS AND METHODS

The experimental procedures and animal care were carried out according to current Spanish legislation (RD53/2013), and the authorization to experiment on living animals was approved by the Bioethical Committee of the Spanish National Research Council (CSIC, Spain) and the competent local authority (Junta de Andalucía, Spain).

Animals, experimental design, and treatments

Animals, diets and experimental design have been described in detail elsewhere (Palma-Granados *et al.*, 2017). Briefly, 14 purebred Iberian (Silvela strain) barrows and 14 LDW barrows from a commercial lean cross were selected at random from 8 and 7 litters of the same age (58 and 50 days, respectively). The pigs were housed in individual pens of 2 m² in an environmentally controlled room. At 10 kg BW animals from both breeds were randomly assigned to each of two experimental diets. Diets were isonitrogenous and isoenergetic containing (per kg DM) 200 g CP and 14 MJ ME (Table 1). One of the diets was adequate in AA and rest of dietary nutrients (AL, 10.9 g lysine/kg DM; NRC, 1998), the other was of identical composition except for the lysine content (DL, 5.20 g lysine/kg DM). In the DL diet, synthetic L-lysine·HCl was replaced by L-glutamic acid and glycine to maintain the same nitrogen concentration as in AL diet. The rest of AA remained constant and in sufficient amounts (NRC, 1998; BSAS,

2003). Daily feed allowance was adjusted on a weekly basis according to a BW function (Conde-Aguilera *et al.*, 2011) and pigs were fed at 85% of *ad libitum* intake of the Iberian genotype, of greater intake capacity (Morales *et al.*, 2002). Feed refusals were collected daily, dried and weighed. Water was freely available.

Table 1
Ingredients and nutrient composition of experimental diets offered to Iberian and Landrace × Large White pigs

Item	Experimental diets ¹	
	AL	DL
Ingredients, g/kg as fed		
Corn	420	420
Barley grain, 2-row	340	340
Soybean protein concentrate, 65% CP	35	35
Corn gluten meal	112	112
Dibasic calcium phosphate	17	17
Calcium carbonate	6.6	6.6
NaCl	5	5
Vitamin/mineral pre-mix ²	3	3
L-lysine·HCl, 78.8%	8.16	-
L-threonine, 98%	2.65	2.65
DL-methionine, 99%	0.4	0.4
L-tryptophan, 98%	1.15	1.15
L-valine, 96.5%	1.8	1.8
L-glutamic acid, 99%	-	4.08
Glycine, 99%	-	4.08
Corn starch	47.14	47.14
Analysed nutrient composition, g/kg DM		
CP	201	199
Lysine ³	10.9	5.20
Methionine	3.77	3.70
Threonine	9.61	9.58
Triptophan ⁴	2.40	2.40
Isoleucine	6.73	6.58
Leucine	22.4	22.5
Histidine	5.17	5.00
Phenylalanine and tyrosine	10.2	10.0
Valine	10.3	10.3
Lipids	25.5	25.8
Total ash	49.5	51.0
Gross energy, MJ/kg	18.66	18.53

¹AL, lysine-adequate content diet; DL, lysine-deficient-content diet.

²Provided (per kg of complete diet) 3.38 mg retinol as retinyl acetate, 56.3 µg cholecalciferol, 25.2 mg dl- α -tocopherol as dl- α -tocopheryl acetate, 1.5 mg menadione as menadione sodium bisulfite, 0.15 mg thiamine, 3 mg riboflavin, 0.15 mg pyridoxine, 15 µg cyanocobalamin, 15 µg folic acid, 22.5 mg nicotinic acid, 15 mg d-pantothenic acid as calcium pantothenate, 15 mg Mn as MnSO₄·4H₂O, 75 mg Fe as FeSO₄·7H₂O, 120 mg Zn as ZnO, 450 µg I as KI, 60 mg Cu as CuSO₄·5H₂O, and 300 µg Co as CoSO₄·7H₂O.

³Equivalent to 54.2 and 26.2 g lysine/kg CP, respectively, for AL and DL diets. ⁴Calculated (FEDNA, 2010).

At the end of study (25 kg BW) pigs were slaughtered by exsanguination after electrical stunning. Immediately after slaughter blood, carcass and organs were weighed separately. Blood samples were taken in EDTA-containing tubes, placed immediately in an ice bath and centrifuged at $1,400 \times g$ at 4°C for 20 min. Plasma was transferred into polypropylene tubes and stored at -80°C until analysed. The eviscerated carcasses (without head and feet) were weighed, divided longitudinally, and kept at -20°C until analysis. Samples of *longissimus dorsi* (*l. dorsi*) and *biceps femoris* (*b. femoris*) from the left side were rapidly dissected, weighed and stored at -20°C until analysis. The right half of the carcass was cut into small pieces and ground in a mincer (Talleres Cato, Sabadell, Spain), homogenized in a cutter (Talleres Cato, Sabadell, Spain) and subsamples were taken for freeze-drying. The *l. dorsi* and *b. femoris* muscles were cut into small pieces, ground in a mincer (Moulinex, Barcelona, Spain) and freeze-dried. After freeze-drying, representative aliquots of carcass and muscles were ground with liquid nitrogen (Retsch Ultra Centrifugal Mill ZM 200; Restch GmbH, Haan, Germany) before analyses.

Chemical Analysis

All analyses were performed in duplicate. Dry matter and N content of feeds, carcass and muscles, and fat and energy content of feeds were determined as described in Palma-Granados *et al.* (2017). Crude protein content was calculated using the factor of 6.25.

The AA concentration of samples of feeds, carcass and muscles were determined after hydrolysis in 6 N HCl plus 1% phenol in sealed, evacuated tubes at 110°C for 24 h by high-performance liquid chromatography (HPLC), according to the Waters Pico Tag method (Cohen *et al.*, 1989) with pre-column derivatization with phenylisothiocyanate using a Waters 2695 separation module (Waters Cromatografía, SA, Spain). The cysteine and methionine contents were determined as cysteic acid and methionine sulphone, respectively, after oxidation with performic acid before protein hydrolysis (Moore, 1963). Tryptophan was not determined.

Plasma free AA concentrations ($\mu\text{mol/L}$) were analysed by HPLC according to the Waters Pico Tag method for free AA with pre-column derivatization with phenylisothiocyanate (Cohen *et al.*, 1989). Before derivatisation, 500 μL of plasma were deproteinized by diluting 1:1 with 20% Trichloroacetic acid and 2mM Norleucine

as an internal standard, and centrifuged at $11,000 \times g$ and 4°C for 15 min. A Millennium 32 chromatography manager system was used for gradient control and data processing.

Statistical analysis

Statistical analyses were assessed by ANOVA using the GLM procedure of SAS. The effects of genotype (Iberian, LDW), lysine content, and their interactions were included in the statistical model. Pig was considered the statistical unit. When interaction between main factors was significant, means from each of the four treatment combinations were compared by one-way ANOVA. Results are expressed as least squares means. Statistical significance was assessed by Tukey's t-test. The level of significance was set to 5%.

RESULTS

All piglets remained healthy during the experiment. Results on growth performance have been published elsewhere (Palma-Granados *et al.*, 2017). Briefly, growth rate and feed efficiency were higher in the LDW breed, and decreased in both pig types when fed the DL diet. Carcass yield was reduced in pigs fed the DL diet. Muscle weights, that were higher in the LDW pigs, were reduced in both pig genotypes when fed the DL diet.

AA composition of carcass

Results on protein and AA concentration in the carcass appear in Table 2. Carcass protein concentration was similar in both pig types when fed the AL diet (151 g CP/kg carcass). Lysine deficiency reduced carcass protein concentration, although the decrease was sharper in Iberian pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.01$). Genotype differences were found for concentration of most indispensable AA (g AA/kg CP carcass). Isoleucine, valine, and phenylalanine were 5 to 9% higher in Iberian pigs ($P < 0.01$), whereas threonine and methionine tended to be lower ($P = 0.06$). No differences in leucine carcass concentration were detected. Genotype \times diet interactions were found for lysine and histidine ($P < 0.05$). Dietary lysine restriction reduced histidine concentration only in the carcass of Iberian pigs (13%). Lysine in

carcass was decreased (13%) in LDW pigs but not in Iberian pigs when both were fed the DL diet ($P < 0.05$). Leucine decreased (6 to 10%, $P < 0.001$) and arginine tended to increase slightly (2 to 4%, $P = 0.09$) in carcass protein of both pig types when fed the DL diet.

Table 2

Effects of genotype and dietary lysine content on protein (g/kg carcass) and amino acid (g/kg CP) concentration in the carcass of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Pig genotype	IB		LDW		SEM	P-value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
Protein	152 ^a	126 ^c	150 ^a	132 ^b	1	NS	***	**
Indispensable AA								
Arginine	82.2	85.4	84.3	86.0	1.4	NS	0.091	NS
Histidine	38.0 ^b	32.9 ^a	38.9 ^b	37.4 ^b	0.8	**	***	*
Isoleucine	33.6	33.8	31.9	30.4	0.8	**	NS	NS
Phenylalanine	37.9	37.7	34.9	32.2	0.9	***	NS	NS
Leucine	67.6	63.5	66.8	60.2	1.3	NS	***	NS
Lysine	66.3 ^b	65.4 ^b	64.9 ^b	56.7 ^a	1.5	**	**	*
Threonine	39.0	39.8	41.1	40.1	0.6	0.060	NS	NS
Valine	47.2	48.0	44.6	44.3	0.7	***	NS	NS
Methionine	19.5	17.7	20.2	19.8	0.7	0.062	NS	NS
Σ indispensable AA	431	424	427	407	4	**	***	NS
Dispensable AA								
Alanine	72.0	75.2	66.0	72.3	1.5	**	**	NS
Aspartic acid	71.3	71.9	82.7	78.7	2.4	***	NS	NS
Glutamic acid	132	134	138	139	2	*	NS	NS
Glycine	102	112	96.1	110	2.7	NS	***	NS
Proline	67.7	68.6	67.1	69.7	1.6	NS	NS	NS
Serine	40.5	41.2	42.8	43.0	0.5	***	NS	NS
Tyrosine	30.8	28.2	30.2	28.3	0.6	NS	**	NS
Cysteine	10.2	9.4	10.5	9.5	0.3	NS	**	NS
Σ dispensable AA	526	540	533	551	4	*	***	NS

^{a-c} Within a row, mean values with unlike superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian pigs; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = lysine-adequate diet (10.9 g lysine/kg DM); DL = lysine-deficient diet (5.20 g lysine/kg DM).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

For dispensable AA, LDW pigs had higher carcass concentrations of aspartic acid, glutamic acid and serine (4 to 14%; $P < 0.05$) and lower of alanine (9%; $P < 0.01$). When pigs were fed the DL diet, alanine and glycine increased (4 to 14%, $P < 0.01$) while tyrosine and cysteine were reduced (6 to 10%, $P < 0.01$). Total indispensable AA

concentration in carcass was higher in Iberian than in LDW pigs ($P < 0.01$), and it decreased in both pig genotypes when the DL diet was offered ($P < 0.001$). Total dispensable AA showed opposite effects.

AA composition of muscles

For *I. dorsi* muscle (Table 3), protein concentration (g/kg) was higher in Iberian than in LDW pigs, and decreased when fed the DL diet, particularly in Iberian pigs (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). Whereas in carcass the most abundant AA were glutamic acid, glycine, arginine followed by alanine and aspartic acid, in this muscle the prevailing AA were glutamic and aspartic acids, lysine, leucine and arginine. Higher concentration of arginine, isoleucine, phenylalanine, lysine and valine (4.6 to 7.5%; $P < 0.001$ to $P < 0.05$) and lower of methionine (7.2%; $P < 0.001$) were observed in *I. dorsi* of Iberian pigs. No genotypes differences were detected for leucine and threonine. Differences in histidine were detected only for Iberian pigs fed the DL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). Pigs fed the DL diet had decreased concentrations of phenylalanine, leucine, lysine, threonine and methionine, and higher of arginine ($P < 0.001$ to $P < 0.05$). Regarding dispensable AA, increased concentrations of alanine, proline and cysteine were found in Iberian pigs but not in LDW when fed the DL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). Glycine increased and tyrosine decreased in pigs fed the DL diet ($P < 0.01$).

The AA composition of *b. femoris* muscle is presented in Table 4. Protein content was higher in Iberian pigs and was reduced in Iberian but not in LDW pigs, when fed the DL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). In general, less changes in AA concentrations due to genotype or dietary lysine deficiency were detected in *b. femoris* in comparison to *I. dorsi* muscle. Arginine was higher and histidine lower in Iberian pigs ($P < 0.01$). Also, less glycine and proline ($P < 0.001$) and higher tyrosine and cysteine concentrations ($P < 0.05$) were observed for Iberian pig muscles. Pigs fed the DL diet tended to have lower lysine concentrations ($P = 0.08$) and had higher glycine content ($P < 0.001$). For alanine a genotype \times diet interaction was detected ($P < 0.01$).

Table 3

Effects of genotype and dietary lysine content on protein (g/kg muscle) and amino acid (g/kg CP) concentration in the longissimus dorsi muscle of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Pig genotype	IB		LDW		SEM	P-value ²		
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	Gen × diet
Protein	204 ^c	158 ^a	180 ^b	157 ^a	6	*	***	*
Indispensable AA								
Arginine	73.1	79.0	69.5	72.8	1.1	***	***	NS
Histidine	50.1 ^{bc}	45.4 ^c	54.5 ^{ab}	57.4 ^a	1.6	***	NS	*
Isoleucine	43.1	41.3	40.7	39.7	0.9	*	NS	NS
Phenylalanine	36.5	35.6	34.9	33.8	0.5	***	*	NS
Leucine	76.9	76.4	77.1	74.0	0.9	NS	*	NS
Lysine	83.6	80.2	79.6	78.0	1.1	**	*	NS
Threonine	43.3	42.8	43.8	42.3	0.3	NS	**	NS
Valine	48.6	47.1	45.2	44.4	0.8	***	NS	NS
Methionine	19.2	14.3	20.7	17.9	0.7	***	***	NS
Σ indispensable AA	475	462	466	460	3	NS	*	NS
Dispensable AA								
Alanine	55.7 ^b	59.1 ^a	57.2 ^{ab}	57.4 ^{ab}	0.7	NS	*	*
Aspartic acid	99.6	95.9	96.1	97.5	1.6	NS	NS	NS
Glutamic acid	162	164	161	163	1	NS	0.054	NS
Glycine	45.6	54.5	51.7	57.0	2.1	*	**	NS
Proline	39.6 ^b	43.6 ^a	46.4 ^a	44.9 ^a	1.2	**	NS	*
Serine	37.6	38.7	39.1	38.5	0.6	NS	NS	NS
Tyrosine	31.9	28.8	29.4	28.3	0.6	*	**	NS
Cysteine	5.10 ^b	6.21 ^a	5.10 ^b	5.25 ^b	0.23	*	**	*
Σ dispensable AA	477	491	486	492	3	NS	**	NS

^{a-c} Within a row, mean values with unlike superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian pigs; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = lysine-adequate diet (10.9 g lysine/kg DM); DL = lysine-deficient diet (5.20 g lysine/kg DM).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 4

Effects of genotype and dietary lysine content on protein (g/kg muscle) and amino acid (g/kg CP) concentration in the biceps femoris muscle of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Pig genotype	IB		LDW		SEM	P-value ²			
	Diet	AL	DL	AL		DL	Gen	Diet	Gen × diet
Protein		193 ^c	170 ^b	168 ^{ab}	161 ^a	3	***	***	*
Indispensable AA									
Arginine		84.0	85.0	80.4	80.3	1.2	**	NS	NS
Histidine		49.6	48.6	51.7	53.4	1.1	**	NS	NS
Isoleucine		43.1	43.8	44.2	43.4	1.0	NS	NS	NS
Phenylalanine		38.4	39.2	39.8	39.7	0.7	NS	NS	NS
Leucine		70.8	71.1	74.1	72.5	1.2	0.057	NS	NS
Lysine		87.3	84.1	86.1	85.4	1.1	NS	0.084	NS
Threonine		44.5	44.4	44.5	44.5	0.4	NS	NS	NS
Valine		46.9	47.1	47.4	46.3	0.0	NS	NS	NS
Methionine		24.9	23.6	23.8	24.4	0.9	NS	NS	NS
Σ indispensable AA		490	487	492	490	3	NS	NS	NS
Dispensable AA									
Alanine		53.6 ^b	55.2 ^a	54.9 ^a	54.8 ^a	0.3	0.069	**	**
Aspartic acid		94.2	92.2	90.6	90.7	1.4	0.083	NS	NS
Glutamic acid		146	144	143	142	2	NS	NS	NS
Glycine		44.4	47.9	46.9	49.7	0.4	***	***	NS
Proline		36.7	38.6	40.1	40.8	0.7	***	0.081	NS
Serine		38.6	38.6	38.1	38.6	0.6	NS	NS	NS
Tyrosine		38.8	37.7	37.3	37.2	0.3	***	*	NS
Cysteine		8.00	8.25	6.89	5.89	0.73	*	NS	NS
Σ dispensable AA		460	463	458	460	3	NS	NS	NS

^{a-c} Within a row, mean values with unlike superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

¹n = 7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian pigs; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = lysine-adequate diet (10.9 g lysine/kg DM); DL = lysine-deficient diet (5.20 g lysine/kg DM).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Plasma free AA concentration

Plasma free AA concentrations ($\mu\text{mol/L}$) are shown in Table 5. Lower concentrations of threonine and methionine in plasma were detected for Iberian pigs ($P < 0.001$), whereas arginine, histidine and the branched chain AA remained similar among genotypes. Lysine content was much higher in Iberian pigs, and the reduction in concentration was more pronounced in this genotype when fed the DL diet (genotype × diet interaction, $P < 0.001$).

Table 5

Effects of genotype and dietary lysine content on amino acid concentration in the plasma ($\mu\text{mol/L}$) of piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Pig genotype	IB		LDW		SEM	P-value ²		Gen × diet
	AL	DL	AL	DL		Gen	Diet	
Indispensable AA								
Arginine	117	80	97	107	12	NS	NS	NS
Histidine	88	72	75	99	10	NS	NS	NS
Isoleucine	175	141	189	135	10	NS	***	NS
Phenylalanine	55	79	64	91	7	NS	**	NS
Leucine	284	205	333	206	25	NS	***	NS
Lysine	126 ^a	48 ^{bc}	68 ^b	37 ^c	7	***	***	**
Threonine	182	286	558	708	103	***	NS	NS
Valine	401	347	399	303	29	NS	*	NS
Methionine	33	37	61	53	5	***	NS	NS
Tryptophan	49 ^a	32 ^b	39 ^b	33 ^b	2	0.064	***	*
Σ indispensable AA	1510	1320	1880	1770	180	*	NS	NS
Dispensable AA								
Alanine	449 ^b	503 ^b	1064 ^a	719 ^b	91	***	NS	*
Anserine	104 ^b	111 ^b	174 ^a	135 ^b	9	***	0.096	*
Aspartic acid	50 ^a	10 ^b	31 ^{ab}	37 ^{ab}	9	NS	0.087	*
γ-amino-butyric acid	30	41	47	67	6	***	*	NS
Glutamine	269	285	422	343	27	***	NS	NS
Glutamic acid	392	228	601	325	55	*	***	NS
Glycine	850 ^a	1116 ^a	1077 ^a	2165 ^b	187	**	**	*
Hidroxi-proline	73	46	76	44	4	NS	***	NS
Ornithine	76	76	101	120	13	*	NS	NS
Proline	316	345	537	628	64	***	NS	NS
Phosphoserine	16	14	35	30	3	***	NS	NS
Serine	239	375	396	536	42	***	**	NS
Taurine	168	189	197	197	17	NS	NS	NS
Tyrosine	148	157	146	218	18	NS	*	NS
Σ dispensable AA	3870	4050	6240	6480	43	***	NS	NS
Σ Total AA	5380	5380	8120	8250	58	***	NS	NS

^{a-c} Within a row, mean values with unlike superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

¹n=7 individually housed piglets per each genotype × diet combination; IB = Iberian pigs; LDW = Landrace × Large White pigs; AL = lysine-adequate diet (10.9 g lysine/kg DM); DL = lysine-deficient diet (5.20 g lysine/kg DM).

²Gen = genotype; NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tryptophan concentration was also higher in Iberian pigs, and decreased only in this pig type when the DL diet was offered (genotype × diet interaction, $P < 0.05$). Branched chain AA decreased (13 to 38%; $P < 0.05$ to $P < 0.001$) and phenylalanine increased ($P < 0.01$) when pigs were fed the DL diet. Concentration of most dispensable AA was reduced in plasma of Iberian pigs in comparison with LDW pigs

(except for hydroxiprolin, taurine and tyrosine). The reduction of dietary lysine increased plasma concentrations of γ -amino-butiryc acid, glycine, serine and tyrosine ($P < 0.05$ to $P < 0.01$) and reduced those of glutamic acid and hydroxiprolin ($P < 0.001$). Alanine decreased in LDW but not in Iberian pigs fed the DL diet (genotype \times diet interaction, $P < 0.05$). The sum of total AA in plasma was 34% lower in Iberian pigs ($P < 0.001$).

DISCUSSION

Genotype effects on AA composition of carcass and muscle

Establishing optimal requirements for protein and AA allows designing balanced diets to optimize growth, development and body functions, minimize budget costs and reduce the environmental impact of pig production. The Iberian pig is a fatty, non-selected pig-type, which according to its lower body protein content and deposition rates, requires less dietary protein concentration than conventional lean pigs during different productive phases (Nieto *et al.*, 2012). However, as stated above, it remains questionable that using the dietary AA pattern established for conventional pigs is adequate for feeding these slow-growing, fatty pigs. One of the objectives of this work was to assess differences in AA composition of carcass and muscles between Iberian and conventional lean pigs in identical experimental conditions. These measurements could be considered as a starting point from which differences in AA requirements between pig genotypes -in terms of AA composition of dietary protein- could be envisaged, despite the influence of other factors such as tissue turnover rates and maintenance AA requirements (Mahan and Shields, 1998). However, comparing breeds of different growth potential implies some difficulties as developmental age of animals may differ, and it needs to be decided whether to use pigs of the same weight or age. To sort out this inconvenient, we used young pigs of the same weight at the start of the experiment and very close in age. Nutritional requirements may differ among breeds and differences may amplify as pigs get older. In the present case, the use of young pigs enables a comparison in similar conditions, as nutrient requirements of breeds are closer at this physiological state (Conde-Aguilera *et al.*, 2011).

The AA composition of carcass protein found in this work is, in general, in the range of previously reported values for carcass of pigs of 20 to 45 kg BW (Bikker *et al.*,

1994; Mahan and Shields, 1998; Hulshof *et al.*, 2017). Regarding the present work, the most common limiting AA in pig diets (lysine, methionine and threonine) are in similar or slightly lower relative amounts in Iberian pig carcasses compared to LDW pigs. It may be of interest the differences in carcass protein concentration found for some indispensable AA, i.e., higher concentrations for isoleucine, valine, and phenylalanine were observed in carcass protein of Iberian pigs. The isoleucine/lysine, valine/lysine and phenylalanine/lysine ratios were 0.51 and 0.49; 0.71 and 0.69; and 0.57 and 0.54 for carcass protein of Iberian and LDW pigs, respectively, which may indicate relatively higher requirements of these three AA for Iberian growing pigs. Most of the breed differences for AA composition noticed in carcass protein were also observed in *I. dorsi* muscle, in which additional differences for arginine, histidine and lysine were detected. The AA composition *b. femoris* muscle was less affected by genotype and restricted to arginine and histidine as indispensable AA. These differences in carcass and muscle indispensable AA composition were not reflected in circulating levels of plasma free AA with some exceptions (lysine, threonine and methionine), although concentrations for the sum of indispensable, dispensable, and total AA was always higher in the LDW pigs, according to their higher protein pool. However, relations among these different AA pools is complex as plasma AA concentrations are the result of inputs from dietary intake and AA released by tissues (proteolysis and *de novo* synthesis, mainly by muscle), and outputs to AA oxidation and metabolism (synthesis of proteins and other molecules).

Genotypes differences in AA composition of *I. dorsi* and *b. femoris* have been reported for pigs at different growth stages (Liu *et al.*, 2015). However, it is difficult to compare with present results as AA composition was reported on muscle weight basis instead of muscle protein basis. In muscle homogenates of French Landrace, Belgian Landrace and Pietrain pigs, Duee *et al.* (1980) found an increase in concentration of some indispensable AA on increasing slaughter weight (lysine, threonine, phenylalanine and methionine), but no difference according to genotype. Nevertheless, a relatively low number of animals per breed was used.

The reason for the genotypes differences detected in our work is unknown, although it could be related to changes in the relative proportions of different carcass proteins, from muscle or other carcass tissues differing in AA composition. Although carcass AA composition is only one of the factors influencing pig AA requirements, it is worth to investigate further the requirements of the branched-chain AA valine and

isoleucine, and phenylalanine of Iberian growing pigs. Improved growth performance could be achieved if diet composition can be optimally adjusted to animal needs. This can be particularly important in young Iberian growing pigs, in which higher protein utilization efficiency is observed compared to heavier animals (Nieto *et al.*, 2012).

Effects of lysine deficiency on AA composition of carcass and muscle

For establishing nutrient requirements the AA composition of body protein has been considered constant, although in pigs, some studies reported alterations in the AA composition of body components related either to changes in protein and energy supply (Bikker *et al.*, 1994) or in body weight (Mahan and Shields, 1998). More recently, changes in the AA composition of carcass, organs, and specific muscles have been also described by Conde-Aguilera *et al.* (2010, 2014, and 2016) for growing pigs fed diets deficient in sulfur AA. We have also detected that feeding a diet deficient in lysine affects the AA composition of carcass protein in young pigs of fatty and lean type. Lysine concentration decreased by 13% only in carcass protein of LDW pigs, probably because the lack of lysine was more severe for lean than for Iberian pigs. Actually, pigs from both types decreased their growth rate when fed the lysine deficient diet, but the decline was greater for LDW pigs (Palma-Granados *et al.*, 2017). However, in *I. dorsi* the reduction in lysine concentration was detected for both pig types. In contrast, Chang and Wei (2005) found no changes in AA concentration of several muscles (including *I. dorsi*) of pigs fed lysine deficient diets, although lysine restriction was shorter than in the present experiment.

Histidine concentration decreased only in protein of carcass and *I. dorsi* of Iberian pigs. When muscle protein degradation occurs, part of histidine is unavailable for reutilization in muscle protein synthesis because of its post-transcriptional methylation to 3-methyl-histidine, which is excreted in urine, although in pigs, partly is accumulated in muscle in the dipeptide balanine, in contrast to other mammalian species (Harris and Milne, 1981). Whether this lower concentration of histidine in the carcass and *I. dorsi* of Iberian pigs fed lysine deficient diets is related to higher muscle protein degradation remains uncertain. In contrast, Conde-Aguilera *et al.* (2016) observed increased histidine concentration in protein of several muscles from pigs fed diets with sulfur AA shortage, which could be related to increased protein breakdown, as 3-methyl-histidine in balanine accumulated in muscle could be recovered after muscle protein hydrolysis. However, no parallel increase in the activity of enzymes

related to muscle protein breakdown as proteasome complex or calpain was detected. We observed a sharp decrease in fractional synthesis rates in muscle protein from growing Iberian and Landrace gilts fed lysine deficient diets (Rivera-Ferre *et al.*, 2005), but muscle protein degradation could not be estimated. Another possibility to explain the decreased histidine muscle concentration is related to the changes in metabolic properties of muscle related to lysine deficiency. Cornet and Bousset (1999) showed that carnosine, a dipeptide which contains histidine, was more abundant in fast-twitch muscles, like the *l. dorsi*, in comparisons with *masseter* or *trapezius* muscles, of more oxidative metabolism, suggesting a carnosine buffering role in the pH decrease produced by anaerobic contraction. Decreased histidine concentration in *l. dorsi* could be related to reduced carnosine content according to the shift to more oxidative metabolism observed in this muscle when pigs were fed a lysine deficient diet (Palma-Granados *et al.*, 2017). Although both fatty and lean pigs were affected, the former pigs showed a stronger oxidative activity.

Leucine concentration decreased in protein of carcass and *l. dorsi* of both types of pigs. Decreased plasma free leucine concentration, and also of the branched-chain isoleucine and valine, were observed in pigs fed the lysine deficient diet. Plasma free AA could resemble plasma free AA pools in tissues available for protein synthesis. In particular, the decrease in plasma free leucine concentration, along with the lower IGF-1 and insulin levels detected in both fatty and lean pigs fed lysine deficient diets (Palma-Granados *et al.* 2017), agree with the decreased muscle protein synthesis rates reported in previous papers, as all these factors stimulate positively muscle protein synthesis via the mTOR signalling pathway (Miyazaki and Esser, 2009).

Contrary to *l. dorsi*, the AA composition of *b. femoris* muscle, particularly indispensable AA concentration, was not affected by lysine deficiency, except for a trend of a lower lysine concentration. There are some differences in AA composition between the two muscles studied, *b. femoris* is richer in indispensable AA concentration compared to *l. dorsi*. Variations in muscle composition and responses may relate to differences in their function and metabolic properties. *Longissimus dorsi* is a predominantly fast-twitch postural muscle, whereas *b. femoris* is a mixed type muscle (Andrés *et al.*, 2001), involved in locomotion. In both types of pigs the response to lysine deficiency followed a similar pattern: both muscles have decreased growth, but only *l. dorsi* changed its protein concentration and amino acid composition significantly, whereas changes in composition of *b. femoris* were rather

moderate. This finding agrees with previous observations in pigs and other species in which predominantly fast-twitch muscles seem more reactive to nutrient restrictions or other external factors than muscles with more oxidative metabolism (Kelly and Goldspink, 1982; Conde-Aguilera *et al.* 2016), and denotes that different proteins and body components may be affected differently by a shortage in lysine supply. It also has been suggested that muscles related to mobility, which develop earlier in life (based on their allometric growth coefficients) are less prone to be affected by external factors (as nutrient shortage) than muscles of higher allometric growth coefficients, like *l. dorsi*, considered a developmentally retarded muscle (Bee *et al.*, 2007).

In conclusion, the breed differences found in concentration of some indispensable amino acids in carcass and muscle protein may indicate relatively higher requirements of these amino acids in Iberian compared to lean pigs, and deserve deeper research on this area. On the other hand, we have found that both fatty and lean pigs responded in general terms in a similar way to a dietary lysine deficiency, modifying the rate of body and muscle growth and modulating the protein composition of specific carcass components, a fact possibly related with their different body functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO grant No. AGL2011-25360). We thank M.A. Liñán for skilful technical assistance. We are also very grateful to Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. (El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain) for providing Iberian purebred animals. Corn gluten meal and corn starch used in this experiment were kindly provided by Tereos Syral (Zaragoza, Spain). P. Palma-Granados had a fellowship from the Spanish MICINN FPI Program (BES-2012-053078). The assays described are part of the doctoral thesis of P. Palma-Granados, under the Doctoral Program of Granada University, Spain.

REFERENCES

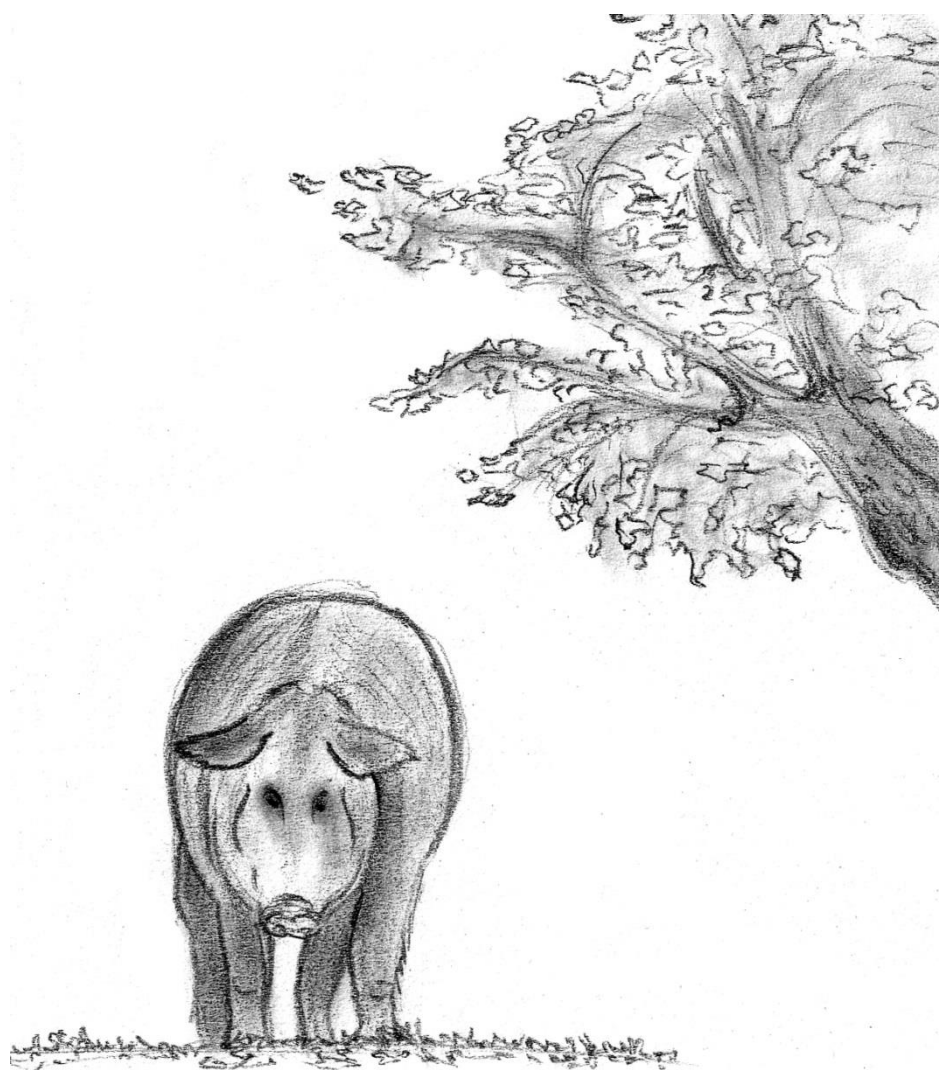
Andrés AI, Cava R, Mayoral AI, Tejeda JF, Morcuende D and Ruiz J 2001. Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. *Meat Science* 59, 39-47.

- Barea R, Nieto R and Aguilera JF 2007. Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism of Iberian pigs growing from 50 to 100 kg. *Animal* 1, 357-365.
- Bee G, Calderini M, Biolley C, Guex G, Herzog W and Lindemann MD 2007. Changes in the histochemical properties and meat quality traits of porcine muscles during the growing-finishing period as affected by feed restriction, slaughter age, or slaughter weight. *Journal of Animal Science* 85, 1030-1045.
- Bikker P, Verstegen MW and Bosch MW 1994. Amino Acid Composition of Growing Pigs Is Affected by Protein and Energy Intake. *The Journal of Nutrition* 124, 1961-1969
- British Society of Animal Science (BSAS) 2003. Nutrient requirement standards for pigs. Penicuik, UK.
- Chang YM and Wei HW 2005. The effects of dietary lysine deficiency on muscle protein turnover in postweanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 1326-1335.
- Chung TK and Baker DH 1992. Efficiency of dietary methionine utilization by young pigs. *The Journal of Nutrition* 122, 1862-1869.
- Cohen SA, Meys M and Tarvin TL 1989. The Pico-Tag method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corporation, Bedford, MA.
- Conde-Aguilera JA, Aguinaga MA, Aguilera JF and Nieto R 2011. Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with different protein concentrations. *Journal of Animal Science* 89, 754-763.
- Conde-Aguilera JA, Barea R, Le Floc'h N, Lefaucheur L and van Milgen J 2010. A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal* 4, 1349-1358.
- Conde-Aguilera JA, Cobo-Ortega C, Mercier Y, Tesseraud S and van Milgen J 2014. The amino acid composition of tissue protein is affected by the total sulfur amino acid supply in growing pigs. *Animal* 8, 401-409.
- Conde-Aguilera JA, Lefaucheur L, Tesseraud S, Mercier Y, Le Floc'h N and van Milgen J 2016. Skeletal muscles respond differently when piglets are offered a diet 30% deficient in total sulfur amino acid for 10 days. *European Journal of Nutrition* 55, 117-126.
- Cornet M and Bousset J 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between red and white muscles. *Meat Science* 51, 215-219.
- Duee PH, Calmes R and Desmoulin B 1980. Composition en acides aminés des protéines musculaires du porc selon le type génétique. In *Annales de zootechnie* 29, 31-37.
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 3rd

- edition. de Blas C, Mateos GG and García Rebollar P. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, Spain.
- García-Valverde R, Barea R, Lara L, Nieto R and Aguilera JF 2008. The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science* 114, 263-273.
- Harris CI and Milne G 1981. The inadequacy of urinary N τ -methyl histidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown. *British Journal of Nutrition* 45, 423-429.
- Hulshof TG, van der Poel AFB, Hendriks WH and Bikker P 2017. Amino acid utilization and body composition of growing pigs fed processed soybean meal or rapeseed meal with or without amino acid supplementation. *Animal* 11, 1125-1135.
- Katsumata M, Matsumoto M, Kobayashi SI and Kaji Y 2008. Reduced dietary lysine enhances proportion of oxidative fibers in porcine skeletal muscle. *Animal Science Journal* 79, 347-353.
- Kelly FJ and Goldspink DF 1982. The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochemical Journal* 208, 147-151.
- Liu Y, Li F, Kong X, Tan B, Li Y, Duan Y, Blanchier F, Hu C and Yin Y 2015. Signaling pathways related to protein synthesis and amino acid concentration in pig skeletal muscles depend on the dietary protein level, genotype and developmental stages. *PLoS one* 10, e0138277.
- Mahan DC and Shields RG 1998. Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *Journal of Animal Science* 76, 513-521.
- Miyazaki M and Esser KA 2009. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *Journal of Applied Physiology* 4, 1367-1373.
- Moore S 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *Journal of Biological Chemistry* 238, 235-237.
- Morales J, Pérez JF, Baucells MD, Mourot J and Gasa J 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn and corn-sorghum-acorn based diets. *Livestock Production Science* 77, 195-205.
- National Research Council (NRC) 1998. *Nutrient Requirements of Swine*, 10th revised edition. National Academic Press, Washington, DC, USA.
- National Research Council (NRC) 2012. *Nutrient Requirements of Swine*, 11th revised edition. National Academic Press, Washington, DC, USA.
- Nieto R, Barea R, Lara L, Palma-Granados P and Aguilera JF 2015. Lysine requirement relative to total dietary protein for optimum performance and carcass protein deposition of Iberian piglets. *Animal Feed Science and Technology* 206, 48-56.

- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Conde-Aguilera JA and Aguilera JF 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science* 90, 3809-3820.
- Nieto R, Miranda A, García MA, Aguilera JF 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs, from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition* 88, 39-49.
- Palma-Granados P, Haro A, Seiquer I, Lara L, Aguilera JF and Nieto R 2017. Similar effects of lysine deficiency in muscle biochemical characteristics of obese and lean piglets. *Journal of Animal Science* 95, 3025-3036
- Rivera-Ferre MG, Aguilera JF and Nieto R 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Nutrition* 135, 469-478.

DISCUSIÓN GENERAL



1. Efecto de la deficiencia de lisina en la dieta sobre el metabolismo muscular y la composición corporal en cerdos Ibéricos y convencionales.

La selección genética en el ganado porcino, realizada con el objetivo de obtener canales más magras, ha dado lugar a un aumento en la velocidad de crecimiento y de tejido magro junto con una reducción en los depósitos grasos, que ha afectado no sólo a la grasa subcutánea, sino también a la intramuscular, estrechamente vinculada con las cualidades organolépticas de la carne. En la búsqueda de mejoras en las características organolépticas de la carne, se han explorado diferentes estrategias nutricionales. Una de ellas es el empleo de dietas deficientes en aminoácidos esenciales. Aunque se han estudiado deficiencias en distintos aminoácidos, parece que sólo las dietas deficientes en lisina ejercen un efecto positivo sobre el depósito de grasa intramuscular. Este objetivo, de claro interés en las razas porcinas convencionales, puede también interesar en el caso de genotipos grasos como el Ibérico u otros similares, en los que sea necesario por las condiciones de producción o manejo el aumento de este parámetro. Parte de los trabajos de esta Tesis Doctoral se han dedicado al estudio del efecto comparado de la deficiencia de lisina en la dieta sobre distintas variables corporales y musculares, con el objetivo no sólo de disponer de una herramienta nutricional capaz de modular la cantidad de grasa depositada en el músculo, sino de conocer las posibles diferencias entre genotipos en los mecanismos implicados en respuesta a esta situación nutricional.

Como hemos comentado, distintos estudios indican que la deficiencia de lisina en la dieta puede ser una estrategia nutricional eficaz para incrementar la deposición de grasa intramuscular en cerdos (Katsumata, 2011), un rasgo ligado a la ternura y jugosidad de la carne (Wood y col., 2008). Sin embargo, el aumento de grasa intramuscular (GIM) ligado a la ingesta reducida de lisina ha sido observado en cerdos de tipo convencional, pero no en cerdos de tipo graso similares al cerdo Ibérico (Madeira y col., 2013). Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron que los efectos de la alimentación con dietas deficientes en lisina sobre el crecimiento y la retención de proteína corporal fueron menos pronunciados en cerdas Ibéricas que en cerdas del genotipo Landrace, de peso similar, mantenidas en idénticas condiciones experimentales (Rivera-Ferre y col., 2006). Este ensayo se diseñó con la finalidad de explorar las diferencias en las respuestas del genotipo Ibérico (como modelo de genotipo graso), frente a uno convencional, a

dietas deficientes en lisina, particularmente sobre la composición bioquímica muscular y los posibles mecanismos implicados en dichas diferencias. Sin embargo, la comparación de razas de diferente potencial de crecimiento implica algunas dificultades, ya que el desarrollo de los animales puede diferir, y se debe decidir si se utilizan cerdos del mismo peso o la misma edad. Para solucionar este inconveniente, se utilizaron cerdos jóvenes del mismo peso al inicio del experimento y muy cercanos en edad. Además, las necesidades de nutrientes pueden variar entre razas y las diferencias se amplifican a medida que los animales aumentan de peso y edad. En el presente caso, el uso de cerdos jóvenes permite una comparación en condiciones similares, ya que las necesidades de nutrientes en las razas empleadas son similares en este estado fisiológico (Conde-Aguilera y col., 2011).

Efectos sobre el crecimiento y la composición corporal

Para igualar la ingesta de nutrientes entre animales de ambas razas, se decidió reducir el aporte de alimento a un 85% de la ingesta voluntaria del genotipo Ibérico. Sin embargo, los cerdos de la raza LDW alimentados con la dieta deficiente en lisina tuvieron una ingesta menor que los del tipo LDW alimentados con el tratamiento adecuado en lisina; mientras que en cerdos Ibéricos la ingesta de alimento no se vio afectada por la deficiencia en lisina, confirmando observaciones anteriores de nuestro grupo (Rivera-Ferre y col., 2005 y 2006). El déficit en algún aminoácido esencial puede causar depresión de la ingesta de alimento (Gietzen y col., 2007) y las diferencias observadas podrían estar vinculadas a distintos mecanismos de regulación de la ingesta relacionados con el genotipo.

Como se esperaba, la tasa de crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento fueron mayores en la raza magra (Rivera-Ferre y col., 2006; Barea y col., 2011). Los efectos de la alimentación con una dieta deficiente en lisina sobre el crecimiento fueron comparativamente superiores en cerdos LDW, lo que corrobora anteriores observaciones en cerdas Ibéricas y Landrace alimentadas con dietas deficientes en lisina (Rivera-Ferre y col., 2006). Probablemente, los cerdos convencionales son más propensos a experimentar una caída del rendimiento en condiciones de producción menos favorables que los cerdos no seleccionados; en este sentido, se ha sugerido que los cerdos altamente seleccionados son más sensibles a las deficiencias nutricionales que los animales con menor potencial de crecimiento (van Lunen y Cole, 1996).

Los efectos del genotipo porcino y el nivel de lisina en metabolitos plasmáticos y hormonas que se han encontrado en este trabajo se ajustan, en general, a las observaciones anteriores del estudio comparativo de Fernández-Fígares y col. (2007) con cerdas Ibéricas y Landrace alimentadas con dietas adecuadas o deficientes en lisina, criadas en condiciones similares. Los cerdos que consumieron dietas deficientes en lisina mostraron un descenso en las concentraciones plasmáticas de insulina y de IGF-1, a la vez que menor crecimiento y mayor concentración de urea plasmática, asociada con el descenso de la eficiencia de utilización de N (Coma y col., 1995). El aumento general de la concentración plasmática de leptina observado en los cerdos que consumieron la dieta deficiente en lisina, más evidente en el caso de los Ibéricos, está en la línea de los resultados obtenidos por Katsumata y col. (2005) y podría estar relacionado con una mayor deposición de grasa con este régimen de alimentación. La grelina, un péptido producido principalmente en el estómago, puede actuar como una señal reguladora del apetito, entre otras funciones (Dong y col., 2009). Existen dos formas activas de grelina, acilada y desacilada, la primera aparentemente asociada con un mayor consumo de alimento y ganancia de peso, y la forma desacilada con el efecto opuesto (Soares y Leite-Moreira, 2008). Sin embargo, no se encontraron en este estudio, efectos del tratamiento dietético ni en las concentraciones de grelina acilada ni en su forma desacilada.

Los pesos relativos de los órganos viscerales se mantuvieron sin cambios cuando los cerdos se alimentaron con la dieta deficiente en lisina, excepto por el intestino grueso y todo el tracto digestivo, que redujeron su tamaño en cerdos LDW; y el hígado y la grasa mesentérica, que aumentaron su peso relativo en ambos tipos de cerdos alimentados con la dieta deficiente. De manera similar, Conde-Aguilera y col. (2010) observaron un aumento en las proporciones del intestino, el hígado y la sangre en cerdos jóvenes Piétrain × (Large-White × Landrace) alimentados con una dieta reducida en aminoácidos azufrados durante aproximadamente 20 días. Sin embargo, no se detectaron efectos significativos sobre el peso relativo del hígado y del intestino delgado cuando los cerdos consumieron la misma dieta durante un período más largo (17 semanas; Conde-Aguilera y col., 2014), lo que indicaría que en un periodo de escasez de nutrientes, los animales tienden a preservar los órganos viscerales -con funciones corporales esenciales- en detrimento de otros tejidos, como los músculos.

Respecto a las proporciones relativas de los componentes de la canal, los resultados mostraron, como era previsible, componentes magros más desarrollados en cerdos LDW (como lomo, jamón, solomillo, exceptuando la paleta) y mayores pesos relativos de los componentes grasos en cerdos Ibéricos (grasa mesentérica, grasa dorsal, grasa interna), lo que corrobora la predisposición a la deposición de grasa corporal en el cerdo ibérico (Nieto y col., 2013). Cuando se limitó el aporte de lisina en la dieta se encontraron, en general, efectos similares sobre los pesos relativos de los componentes de la canal para ambos tipos de cerdos, es decir, una reducción de las partes magras y un incremento de los componentes predominantemente grasos. Estos cambios se corresponden con los detectados en la composición química de la canal (descenso en la concentración proteica y en la cantidad de agua y aumento en el contenido lipídico y energético). Estos efectos están en la línea de otros descritos en la literatura, como la reducción de la retención de nitrógeno (Roy y col., 2000; Rivera-Ferre y col., 2006) y de las tasas fraccionales de síntesis proteica muscular (Rivera-Ferre y col., 2005) cuando los cerdos se alimentan con dietas insuficientes en lisina. En lechones de tipo convencional alimentados con dietas deficientes en metionina y cisteína, Conde-Aguilera y col. (2010) también encontraron menor concentración de proteína y agua y mayor deposición de lípidos en la canal que en los cerdos de un grupo control. Sin embargo, otros autores que observaron un incremento de la GIM cuando alimentaron a los cerdos con una dieta deficiente en lisina (Katsumata y col., 2005) o una dieta reducida en proteína (Doran y col., 2006) no encontraron un mayor espesor de la grasa dorsal, que usualmente se considera un indicador de la deposición total de lípidos en la canal. Probablemente, las razones de estas discrepancias derivan de la edad de los cerdos, mucho más jóvenes en este caso y en el estudio de Conde-Aguilera y col. (2010) y, probablemente, más susceptibles al suministro deficiente de aminoácidos.

Respecto al peso relativo de los músculos *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris*, también fue mayor en el genotipo convencional, al igual que el resto de componentes magros. Existe una relación positiva entre la aceptabilidad o la terneza de la carne de cerdo y el contenido en GIM (Font-i-Furnols y col., 2012). Al igual que en otras razas de cerdo mediterráneas tradicionales, los músculos de los cerdos Ibéricos presentan contenidos relativamente altos de GIM (Lopez-Bote, 1998; Lebret, 2008; Pugliese y Sirtori, 2012). En nuestro trabajo, el contenido de GIM de *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* también fue mayor en cerdos Ibéricos. Además, aumentó en ambos genotipos alimentados con la dieta deficiente en lisina (aunque en *Longissimus dorsi* de los

cerdos LDW, el aumento numérico no alcanzó significación estadística). Estas observaciones coinciden con ensayos previos en los que una disminución de lisina en la dieta -manteniendo el mismo contenido de proteína bruta- condujo a un aumento significativo en la GIM en *Longissimus dorsi* de cerdas en fase de acabado (Katsumata y col., 2005). Otros autores también han documentado el aumento de GIM cuando se disminuye la concentración de lisina, manteniendo constante el nivel de proteína bruta de la dieta (Tous y col., 2014). El efecto sobre la GIM parece estar relacionado directamente con la lisina. Kobayashi y col. (2012) encontraron que la disminución de otros aminoácidos esenciales como la treonina no tenía ningún efecto sobre la concentración de GIM. Por otro lado, Rodríguez-Sánchez y col. (2011) no encontraron ningún efecto significativo en la GIM del músculo *Longissimus thoracis* cuando la concentración de lisina disminuyó de 7 a 6 g/kg en machos castrados y cerdas en acabado. Madeira y col. (2013) también encontraron que la GIM del músculo *Longissimus lumborum* aumentó en cerdos magros alimentados con una dieta reducida en proteína bruta y en lisina (13,1% de PB y 0,40% de Lys); sin embargo, no obtuvieron un aumento de GIM si en la dieta reducida en proteína bruta se ajustaba el contenido de lisina (13,2% CP y 0,56% Lys). En contraste con nuestros resultados, no encontraron ningún efecto de los mismos tratamientos dietéticos sobre la GIM de *Longissimus lumborum* de cerdos Alentejanos, similares a los Ibéricos. En nuestra opinión, en este último caso, los tratamientos dietéticos, que eran los mismos para ambos genotipos porcinos, magro y graso, posiblemente proporcionaron un exceso de proteína en la dieta respecto a las necesidades de los cerdos Alentejanos (por lo tanto, no se encontraban en condiciones deficientes en lisina), según trabajos anteriores de nuestro grupo en cerdos Ibéricos del mismo rango de peso (Barea y col., 2006 y 2007).

La bellota presenta una baja cantidad de proteína con una marcada deficiencia en lisina (Nieto y col., 2002; García-Valverde y col., 2010). Este régimen nutricional probablemente limita la deposición de tejido magro en las piezas nobles, pero por otra parte, puede mejorar la deposición de GIM. Para los cerdos Ibéricos finalizados en condiciones intensivas, esta estrategia nutricional podría utilizarse para obtener contenidos más altos de GIM en la carne. Sin duda, es conveniente continuar investigando en esta área para obtener información más precisa en este aspecto.

El perfil de ácidos grasos de la GIM, tanto de *Longissimus dorsi* como de *Biceps femoris* mostró un claro aumento en la concentración de ácido oleico en cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina. Según Wood y col. (2008), las proporciones de ácidos grasos cambian a medida que aumenta el contenido de grasa de los tejidos. De acuerdo con estos autores, a medida que crece el animal, la proporción de C18: 1 n-9 aumenta y la de C18: 2 n-6 disminuye, lo que está ligado al papel creciente de la lipogénesis de ácidos grasos monoinsaturados y a la disminución relativa de la incorporación directa de ácidos grasos esenciales desde la dieta. En este caso encontramos un aumento en C18:1 n-9 y una disminución en C18:2 n-6, C18:3 n-3 y ácidos grasos poliinsaturados totales en la GIM de *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* en cerdos de ambos genotipos alimentados con dietas deficientes en lisina, lo que nos indicaría un aumento de la lipogénesis en estos tejidos.

Nuestras observaciones sobre los músculos están en línea con las de Katsumata y col. (2005) en *Longissimus dorsi* de cerdas en fase de acabado alimentadas con dietas deficientes en lisina. Madeira y col. (2013) también encontraron un aumento de C18:1 n-9 (mg/100 g de músculo) en *Longissimus lumborum* de cerdos magros alimentados con una dieta reducida en lisina en comparación con cerdos control, aunque no se detectó este efecto en cerdos grasos. Tous y col. (2014) obtuvieron un aumento de ácidos grasos monoinsaturados y disminución de ácidos grasos poliinsaturados en la GIM de *Longissimus lumborum* de cerdos alimentados con dietas reducidas en proteína, pero no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos de la GIM de cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina. Las diferencias obtenidas entre estudios podrían estar relacionadas con el grado de deficiencia de lisina utilizado en las dietas experimentales y el rango de peso de los cerdos. Daza y col. (2012) describieron una relación positiva entre la proporción de C18:1 n-9 y la GIM en el músculo *Longissimus thoracis* de cerdas cruzadas pesadas, que está en consonancia con nuestras observaciones y parte de los estudios mencionados anteriormente. En este sentido, según Ntawubizi y col. (2009), el aumento de ácidos grasos monoinsaturados y la disminución de las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados conforme se incrementa el contenido de GIM podría estar relacionado con la distribución desigual de los ácidos grasos entre los triacilglicéridos y los fosfolípidos, y el aumento en la proporción de triacilglicéridos a medida que la GIM incrementa.

Mecanismos relacionados con el aumento de grasa intramuscular

Para investigar los posibles mecanismos implicados en la deposición de grasa promovida por la deficiencia de lisina dietética, y las respuestas en tejidos como músculo y grasa dorsal subcutánea de los dos genotipos estudiados, se determinaron la actividad y la expresión génica de enzimas lipogénicas clave como la FAS, que cataliza la vía de síntesis de palmitato a partir de malonil-CoA; y las enzimas ME y G6PDH, involucradas en la provisión de NADH para la biosíntesis reductiva de ácidos grasos. La cantidad de lípidos depositados en los tejidos del cerdo depende del equilibrio entre distintos procesos, como el depósito de los lípidos procedentes de la dieta, la síntesis *de novo* y la lipólisis y oxidación de ácidos grasos. Kloareg y col. (2007) sugirieron que la síntesis *de novo* en los tejidos representa más del 80% de la deposición total de ácidos grasos en el cerdo; por lo tanto, las vías lipogénicas tendrían un papel preponderante en el depósito de lípidos tisular. Aunque existen algunas discrepancias, la actividad catalítica determinada en cada tejido se corresponde, en general, con el análisis de la expresión de los genes que codifican cada una de estas enzimas. En líneas generales, observamos una mayor capacidad de síntesis lipídica tisular en cerdos Ibéricos (mayor actividad de ME y G6PDH y mayor expresión de *ME1* en grasa dorsal; mayor actividad FAS y expresión de *FASN* en *Longissimus dorsi*; y mayor actividad de ME y expresión de *G6PD* y *ME1* en *Biceps femoris*), que concuerda con trabajos previos en los que se compara la actividad enzimática lipogénica en lechones convencionales y Alentejanos (Freire y col., 1998), y en cerdos Ibéricos y convencionales en fase de acabado (Morales y col., 2002). Sin embargo, en lechones de 15 días de edad, de los mismos genotipos utilizados en el presente estudio, no hemos detectado diferencias debidas al genotipo en la actividad lipogénica en la grasa dorsal subcutánea y en *Longissimus dorsi* (Palma-Granados y col., 2017), por lo que suponemos que estas diferencias se desarrollan y acentúan al avanzar la edad de los animales.

Los efectos de la deficiencia de lisina sobre la actividad enzimática lipogénica y la expresión génica fueron diferentes en el tejido adiposo subcutáneo dorsal y en los músculos estudiados. A pesar de que las proporciones de grasa dorsal aumentaron en cerdos Ibéricos y LDW al consumir la dieta deficiente en lisina, la actividad y la expresión génica de las enzimas lipogénicas en general disminuyeron o no se modificaron. Madeira y col. (2013) no encontraron cambios en la expresión de *FASN* en la grasa dorsal de los cerdos deficientes en lisina. Por el contrario, en lechones

jóvenes Pietrain × LDW, alimentados con una dieta deficiente en metionina, la actividad de FAS, ME y G6PDH se elevó y se observó una regulación positiva de los genes *FASN* y *ME1* en la grasa dorsal al aumentar el contenido de lípidos (Castellano y col., 2015), lo que indica posibles diferencias entre los efectos causados por la deficiencia en metionina y lisina sobre la lipogénesis del tejido adiposo.

Nuestros resultados muestran una falta de correlación entre las proporciones de grasa dorsal subcutánea y la actividad enzimática lipogénica en los cerdos del presente trabajo. Otros mecanismos, distintos de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y triglicéridos, deben estar involucrados en el incremento del tejido adiposo dorsal en cerdos alimentados con dietas restringidas en lisina (aumento de la deposición de ácidos grasos desde la dieta, descenso de la tasa de lipólisis, o ambos). Por el contrario, en estos mismos animales el contenido de GIM de *Longissimus dorsi* mostró una fuerte correlación con la actividad de FAS (0.8), G6PDH (0.6) y ME (0.7), relacionada, a su vez, con la regulación positiva de la expresión génica en este músculo, particularmente en cerdos Ibéricos. En el caso del *Biceps femoris*, el aumento del contenido de GIM en los cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina se relacionó con el aumento de la actividad de las enzimas FAS y ME, y la regulación positiva de *ME1* (y *FASN* en el caso de los cerdos Ibéricos). En este sentido, en cerdos convencionales alimentados con dietas reducidas en su contenido proteico (Doran y col., 2006) o deficientes en lisina (Madeira y col., 2013), el aumento de GIM en el músculo *Longissimus dorsi* se relacionó con una mayor expresión proteica y génica, respectivamente, de la enzima SCD, pero no se detectaron efectos en el tejido adiposo dorsal.

Nuestros datos señalan, al igual que los de otros autores (Mourot y Kouba, 1999; Gondret y Lebret, 2002), la estrecha relación entre la actividad de ME y el depósito de GIM ya que es, con diferencia, la enzima lipogénica con mayores tasas de actividad en músculo. Nuestros resultados sugieren que la actividad enzimática lipogénica y la expresión génica están reguladas de forma diferente en el tejido adiposo subcutáneo y en el músculo esquelético de los lechones de los dos genotipos estudiados. En este sentido, las distintas respuestas a la deficiencia en lisina encontradas en el tejido adiposo subcutáneo y en la GIM en relación a la actividad enzimática y expresión génica pueden estar relacionadas con que la GIM es el último depósito graso en desarrollarse (Gondret y Lebret, 2002), y puede, por tanto, responder a los cambios nutricionales de manera diferente a otros depósitos grasos.

Otro mecanismo que podría estar implicado en el aumento de GIM cuando se reduce la ingesta de lisina sería la reducción de la actividad lipolítica en el tejido muscular. La L-carnitina se sintetiza a partir de los aminoácidos esenciales lisina y metionina, por lo que cambios en el suministro de lisina pueden afectar a la concentración de L-carnitina en los tejidos. En consecuencia, planteamos la hipótesis de que una restricción de lisina en la dieta conduciría a una reducción de la concentración de L-carnitina en los músculos de los animales alimentados con este tratamiento. La L-carnitina es esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde el citosol hasta la matriz mitocondrial donde ocurre la β -oxidación (Vaz y Wanders, 2002), de manera que un descenso en la concentración de L-carnitina en músculo, que diera lugar a la reducción del transporte y de la tasa de oxidación de los ácidos grasos, podría contribuir a explicar el mayor contenido de GIM en cerdos que consumen dietas deficientes en lisina. Sin embargo, lo que observamos es que la concentración de L-carnitina libre aumentó en los músculos de los cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina respecto al grupo control. Nuestros resultados contrastan con los de Katsumata y col. (2005), que obtuvo una disminución de la concentración de L-carnitina libre en *Longissimus dorsi* de cerdas en fase de acabado alimentadas con dietas deficientes en lisina. No tenemos una explicación satisfactoria para esta discrepancia, aunque podría estar relacionada con las diferencias en edad y peso vivo entre los animales de ambos estudios. Los resultados comentados indicarían, por tanto, que el aumento en GIM obtenido en los cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina estaría relacionado con una mayor actividad lipogénica y no con un descenso de la actividad lipolítica en el tejido muscular.

Por otra parte, se encontró una mayor actividad oxidativa (NADH deshidrogenasa, una enzima de la cadena respiratoria mitocondrial) en fibras de *Longissimus dorsi* de cerdos Ibéricos y LDW alimentados con la dieta restringida en lisina. Katsumata y col. (2008) encontraron una mayor proporción de fibras oxidativas, así como de actividad citrato sintasa (otro indicador del metabolismo oxidativo celular), en los músculos *Longissimus dorsi* y *Rhomboideus* de cerdos machos castrados alimentados durante 3 semanas con una dieta deficiente en lisina. Estos autores también observaron mayor abundancia de ARNm de PGC-1 α (un regulador de la biogénesis de mitocondrias; Puigserver y col., 1998; Wu y col., 1999), en músculos de lechones alimentados con dietas deficientes en lisina. Recientemente,

Conde-Aguilera y col. (2016) describieron que la proporción de fibras de Tipo I (predominantemente oxidativas) y la actividad citrato sintasa aumentaron en los músculos *Longissimus* y *Rhomboideus* de lechones alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados durante 10 días. Los efectos de los cambios nutricionales sobre las propiedades bioquímicas de los músculos fueron descritos por Karlsson y col. (1993), que mostraron mayor capacidad glicolítica y menor capacidad oxidativa y GIM en los músculos de cerdos alimentados con dietas ricas en proteínas. En conjunto, estos resultados nos indican que en los cerdos jóvenes, las propiedades metabólicas de las fibras musculares pueden modificarse por factores nutricionales, entre ellos, la deficiencia de un solo aminoácido esencial. De acuerdo con nuestros resultados, la abundancia de fibras oxidativas en *Longissimus dorsi* fue mayor en cerdos Ibéricos que en los cerdos LDW. Estudios sobre la abundancia de fibras musculares realizados en otras razas nativas (con menor potencial para depositar tejido muscular en comparación con razas más magras), mostraron un aumento en las proporciones de fibras oxidativas (más ricas en mitocondrias y lípidos) en comparación con cerdos convencionales (Lefaucheur y col., 2004; Wimmers y col., 2008; Guo y col., 2011). Curiosamente, en nuestro estudio, los cerdos con una mayor proporción de fibras musculares oxidativas (Ibérico vs LDW; cerdos alimentados con dietas deficientes vs cerdos alimentados con dietas adecuadas en lisina) mostraron también un aumento de la concentración de L-carnitina libre en músculo, lo que podría estar relacionado con una mayor capacidad de utilización de lípidos como sustrato energético en las células musculares. En humanos, se ha sugerido la existencia de una relación entre la concentración de carnitina muscular y el potencial oxidativo (Cederblad y col., 1976; Gatti y col., 1998). En nuestro caso encontramos mayor concentración de L-carnitina libre plasmática en cerdos Ibéricos en comparación con LDW, pero no se detectó ningún efecto de la dieta sobre este parámetro.

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración y composición de la grasa intramuscular puede ser manipulada en lechones de raza Ibérica y convencional alterando la concentración de lisina dietética. El empleo de esta estrategia nutricional en cada genotipo implica ajustarla en tiempo, intensidad, y concentración en cada caso para obtener los niveles deseados en cerdos de cebo, de modo que se penalice al mínimo el crecimiento y la retención de tejido magro, a la vez que se incremente la

grasa intramuscular. Para ello será necesario realizar estudios en el futuro diseñados con esta finalidad.

2. Diferencias en la composición nutricional y características bioquímicas de músculos de cerdos Ibéricos y de una raza porcina convencional a distintos pesos de sacrificio, en idénticas condiciones nutricionales y de manejo

Aunque diversos trabajos han puesto de manifiesto las diferencias en cuanto a composición corporal del genotipo Ibérico y las razas porcinas convencionales, se han realizado muy pocos estudios en los que se compare a estas razas manteniéndolas bajo condiciones de alimentación y de manejo idénticas. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan conocimientos previos sobre el contenido y la composición de la grasa del cerdo Ibérico, pero además muestran que éstos mantienen su alto contenido en GIM en comparación con cerdos de tipo magro incluso con un manejo nutricional idéntico. En el estudio de Ventanas y col. (2006) se observaron valores de GIM entorno al 4,2% para los músculos *Biceps femoris* de cerdos Ibéricos con un peso corporal de 160-170 kg, valores similares a los encontrados en nuestro estudio, y mayores que el 2,4% de GIM que presentan cerdos de cruces Ibéricos x Duroc. Por otro lado, el contenido de GIM en *Biceps femoris* de cerdos de raza magra es aún menor (1,9-2,2%) (Lebret y col., 2011). En otros músculos como *Longissimus thoracis* de cerdos Ibéricos x Duroc, la cantidad de GIM encontrada fue entorno a un 3,5-5,9% (Ramírez y Cava 2007), también inferior a la observada en el presente ensayo para Ibéricos puros.

Según nuestros resultados, el nivel de proteína en la dieta influyó en el contenido de GIM de los músculos *Longissimus thoracis* de ambos tipos de cerdos en la etapa de crecimiento y de cerdos Ibéricos en la fase de acabado, pero no se produjo ningún efecto sobre la GIM del músculo *Biceps femoris*. El descenso en el nivel proteico de la dieta sólo produjo efectos menores en el perfil de ácidos grasos de los músculos, y ninguno sobre los índices globales. Es un efecto mucho más moderado que el provocado por una disminución notable en la concentración de lisina en la dieta, como se ha comentado en el apartado anterior. El cerdo Ibérico es conocido por presentar una gran proporción de ácido oleico en su grasa intramuscular (Cava y col., 2000). El contenido en ácidos grasos monoinsaturados encontrado en el presente ensayo en músculos de cerdos Ibéricos (casi el 55% de los ácidos grasos totales a 115 kg de peso) está en general de acuerdo con los datos publicados en la bibliografía (Ventanas y col., 2006; Tejerina y col., 2012). Por otro lado, se han registrado valores más bajos de ácidos grasos saturados y mayores de ácidos grasos poliinsaturados que

los observados en el presente experimento en el músculo *Longissimus thoracis* de cerdos Ibéricos criados al aire libre y sacrificados a 150 kg (ácidos grasos saturados 33,2-34,2% vs 40,6%, ácidos grasos poliinsaturados 8,8-9,5% vs 5,01%) (Muriel y col., 2004). El sistema de producción tiene un claro efecto en el perfil de ácidos grasos de los músculos, y se ha demostrado que los músculos de cerdos cebados en montanera (a base de bellota) tienen cantidades significativamente mayores de ácido oleico (> 50%) que los cerdos criados bajo manejo intensivo (Tejerina y col., 2012), que muestran valores similares a los observados en el presente ensayo.

La composición mineral de los músculos porcinos recibe habitualmente poca atención por parte de los productores, con la posible excepción del hierro. Sin embargo, la carne de cerdo puede ser una valiosa fuente de minerales en la dieta humana, particularmente en el caso del Fe y el Zn (Reig y col., 2013). Las diferencias en el contenido total de cenizas de los músculos entre cerdos Ibéricos y magros se observaron a 50 kg, pero no en la fase de acabado. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en el contenido de minerales traza y de fósforo. Así, con un peso vivo cercano al peso habitual de sacrificio, los lomos y jamones de cerdos Ibéricos son una mejor fuente de Fe y Zn que los músculos de cerdos magros. En nuestro estudio, se encontró un contenido en Fe de hasta 21,8 mg/kg en cerdos Ibéricos, mientras que los músculos de los cerdos magros no superaron los 13,7 mg de Fe/kg, lo cual es debido a un mayor contenido de pigmentos hemo, como la mioglobina (Ventanas y col., 2006). El contenido de pigmentos se ve afectado por la fisiología muscular, las fibras oxidativas tienen mayor contenido en pigmentos hemo que las de tipo glucolítico. Así, el mayor contenido de Fe en los músculos Ibéricos encontrados en este trabajo puede estar relacionado con el mayor metabolismo oxidativo en los músculos de esta raza (Serra y col., 1998).

En cuanto al color instrumental, este parámetro se ha utilizado ampliamente para evaluar la calidad de la carne en porcino. Con este propósito, las coordenadas de color (CIELAB) del músculo han sido determinadas en diferentes líneas del genotipo Ibérico (Muriel y col., 2004), en cerdos Ibéricos criados bajo diferentes sistemas de producción (González y col., 2012; Tejerina y col., 2012), en cruces de la raza Ibérica (Carrapiso y García, 2005; Ventanas y col., 2006; Ramírez y Cava, 2007) y también en carne procedente de razas porcinas convencionales (Heyer y Lebret, 2007; Lebret y col., 2011; Needham y Hoffman, 2015). Sin embargo, no conocemos ningún estudio

que compare las características de color de la carne de cerdos Ibéricos puros y cerdos de tipo magro bajo el mismo manejo nutricional.

Los resultados de nuestro ensayo muestran que los músculos de cerdo Ibérico fueron más oscuros y rojizos que los de cerdos magros. Estas características hacen más atractiva la carne para los productores y los consumidores (Straadt y col., 2013). Las diferencias de color encontradas entre cerdos Ibéricos y LDW son similares con las observadas entre Ibéricos puros y cruzados con Duroc, ya que los músculos de cerdos Ibéricos puros son más oscuros y rojos que los de animales cruzados (Ventanas y col., 2006). También se ha descrito que los diferentes patrones metabólicos de los músculos afectan al color instrumental, tanto en cerdos Ibéricos (Ramírez y Cava, 2007; Tejerina y col., 2012) como en cerdos convencionales (Lebret y col., 2011). En este sentido, el músculo *Longissimus thoracis* fue más pálido (mayor L*) y menos rojo (a* inferior) comparado con el *Biceps femoris*, que tiene un mayor contenido de fibras oxidativas (Ramírez y Cava, 2007). El color rojo en los músculos se atribuye a la presencia de pigmentos heme y al contenido de Fe (Muriel y col., 2004), y la luminosidad se ha relacionado con la composición de ácidos grasos, ya que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados puede hacer la grasa más fluida, lo que conduce a un aumento del reflejo de la luz desde la superficie de la carne, aumentando el valor de L* (Ventanas y col., 2006).

Con el objetivo de encontrar posibles relaciones entre la composición lipídica y mineral del músculo y los parámetros de color, realizamos un estudio de correlación. Los resultados obtenidos muestran correlaciones entre el tono rojo y el contenido de Fe en el músculo *Longissimus thoracis*, y entre el valor de a* y el contenido en Zn en ambos músculos. En *Biceps femoris*, además, la intensidad del color rojo se relacionó negativamente con el contenido en Mg y P, mientras que el color amarillo (b*) se correlacionó negativamente con los valores de Zn y positivamente con el contenido de Cu en ambos músculos. También se observaron relaciones entre Zn y L* en *Biceps femoris*. Los valores cromáticos y de tono también se afectaron significativamente por el contenido de Cu y Zn en el músculo, y el tono se relacionó también con el contenido en fósforo. Estos resultados, en conjunto, indican que otros minerales aparte del Fe (particularmente el Zn) pueden influir en los parámetros de color, y por consiguiente, en la calidad global de la carne de cerdo; y que músculos que difieren en el metabolismo de las fibras (oxidativo o glicolítico) tienen diferentes relaciones entre los minerales y el color.

Según la bibliografía, existe relación entre la luminosidad, el contenido de grasa y la composición en ácidos grasos de la carne (Andrés y col., 2000). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron relaciones entre L^* y la GIM de los músculos, aunque se obtuvo una correlación positiva entre la GIM, el color rojo (a^*) y el brillo (croma) en *Biceps femoris*. Además, en este músculo, el valor de a^* se relacionó de manera positiva con el contenido en ácidos grasos monoinsaturados y negativamente con los niveles de ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, en el músculo *Longissimus thoracis*, se encontró correlación negativa entre el valor de a^* y la proporción en ácidos grasos poliinsaturados. Por lo tanto, en el músculo *Biceps femoris*, la medición del color rojo podría ser un buen indicador del contenido de grasa total y ácidos grasos monoinsaturados, ambos parámetros muy apreciados en la carne de cerdo Ibérico. El color amarillo (b^*) se correlacionó negativamente con el contenido en ácidos grasos monoinsaturados y positivamente con la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, es decir, el comportamiento opuesto que el encontrado para la coordenada a^* . En un análisis de regresión sobre la importancia relativa de cada ácido graso en las características globales de la grasa de cerdos, se identificó al ácido linoleico como el ácido graso que mejor explicaba la variación en la coloración amarilla (Maw y col., 2003), lo que nos corrobora la relación encontrada en este estudio entre C18:2 n6 y la coordenada b^* . Como los ácidos grasos son incoloros, se ha propuesto que la correlación entre el color amarillo y el ácido linoleico (que como ácido graso esencial procede de la dieta) puede deberse a un aumento en la concentración de los pigmentos asociados con alimentos que contienen estos ácidos grasos (Maw y col., 2003). Según nuestros resultados, podemos sugerir que las diferencias en el perfil de ácidos grasos entre cerdos Ibérico y magros pueden tener consecuencias importantes en las características de color de la carne.

3. Influencia del genotipo en la composición en aminoácidos de las proteínas corporales y en la repuesta a la restricción de lisina en la dieta. Posibles consecuencias sobre el ajuste del perfil proteico ideal para el cerdo Ibérico en crecimiento.

Efectos del genotipo sobre la composición de aminoácidos de las proteínas corporales

Establecer las necesidades óptimas en cuanto a cantidad de proteína y de aminoácidos (AA) para los animales de producción nos permite formular dietas equilibradas para maximizar el crecimiento y el desarrollo de las funciones corporales, a la vez que se reduce el coste económico y el impacto medioambiental que conlleva la producción ganadera.

Por la información disponible conocemos que las características metabólicas del cerdo Ibérico hacen que éste requiera menor concentración de proteína en la dieta que los cerdos convencionales durante diferentes fases productivas (Nieto y col., 2012). Sin embargo, desconocemos si la utilización del perfil de AA dietético establecido para cerdos convencionales es adecuado también para alimentar a estos cerdos grasos, de crecimiento lento. Las necesidades de aminoácidos en los animales de producción pueden verse afectadas por factores diversos, tales como peso corporal, ritmo de crecimiento, sexo, genotipo, condiciones ambientales y estado de salud del animal (Moughan, 1989; Fuller, 1991 y 1994). Sin embargo, generalmente se considera que los cambios en necesidades no dan lugar a modificaciones en el perfil de aminoácidos, sino a alteraciones en la cantidad total requerida de los mismos, manteniéndose constantes las relaciones entre ellos. En ello se basa el concepto de proteína ideal que se emplea en la formulación de dietas para porcino y que podemos definir como el balance perfecto de aminoácidos esenciales (o indispensables) necesario para las funciones de mantenimiento y producción (Boisen y col., 2000). Este es un concepto muy útil para la formulación práctica de dietas, que descansa en la idea de que la composición de la proteína corporal es invariable. A pesar de ello, en estudios recientes se ha observado que en animales alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados se produce una alteración en la composición de la proteína corporal (Conde-Aguilera y col., 2010 y 2014). Los cambios ocurridos en el perfil de aminoácidos pueden deberse a alteraciones relativas en los tipos de proteínas (Chung y Baker, 1992) o al tipo y cantidad de fibras musculares (Katsumata y col., 2008).

Uno de los propósitos de los trabajos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral fue realizar un estudio comparativo detallado de la composición en aminoácidos de la proteína corporal en la raza Ibérica y en una raza convencional, en condiciones experimentales idénticas. Estas determinaciones pueden considerarse una primera aproximación para conocer posibles diferencias en necesidades de aminoácidos esenciales en la raza Ibérica (en términos de composición de AA de la proteína dietética) a pesar de la influencia que otros factores como las tasas de renovación proteica en los tejidos y las necesidades de AA para el mantenimiento (Mahan y Shields, 1998) pueden tener sobre las necesidades globales de aminoácidos.

La composición de AA de la proteína de la canal encontrada en este trabajo se sitúa, en general, dentro del rango de valores previamente documentados para cerdos de 20 a 45 kg de peso corporal (Bikker y col., 1994; Mahan y Shields, 1998; Hulshof y col., 2017). Según nuestros resultados, los AA limitantes más comunes en las dietas para porcino (lisina, metionina y treonina) están en cantidades relativas similares o ligeramente menores en las canales de cerdo Ibérico en comparación con los cerdos LDW. Las diferencias encontradas en el perfil de aminoácidos, en concreto en los AA indispensables en la proteína de la canal, pueden ser interesantes. Por ejemplo, se observaron mayores concentraciones relativas de isoleucina, valina y fenilalanina en la proteína de la canal de los cerdos Ibéricos. Las relaciones isoleucina / lisina, valina / lisina, y fenilalanina / lisina fueron de 0,51 y 0,49; 0,71 y 0,69; y 0,57 y 0,54 para la proteína de canales de cerdos ibéricos y LDW, respectivamente, lo que puede indicar unas necesidades relativamente superiores de estos tres AA para cerdos Ibéricos en crecimiento. La mayor parte de las diferencias encontradas para el patrón de AA de la proteína de la canal entre genotipos también se observaron en el músculo *Longissimus dorsi*, en el que se detectaron diferencias adicionales para arginina, histidina y lisina. En cambio, el perfil de AA para el músculo *Biceps femoris* fue similar entre genotipos, con leves diferencias en el contenido de los AA indispensables arginina e histidina. Estas diferencias en la composición en AA de la canal y del músculo no se reflejaron en los niveles circulantes de AA libres en plasma con algunas excepciones (lisina, treonina y metionina), aunque las concentraciones de la suma de AA indispensables, dispensable y totales fueron siempre mayores en los cerdos LDW, de acuerdo con su mayor masa proteica corporal. Aunque se han descrito en la bibliografía diferencias debidas al genotipo en la composición de AA de los músculos *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* para cerdos en diferentes etapas de crecimiento (Liu y col., 2015), es difícil establecer comparaciones con los resultados obtenidos en

este trabajo ya que los resultados de Lui y col. (2015) se refieren a composición en AA tomando como referencia el peso del músculo y no a la proteína muscular. Por otra parte, en homogenados de músculo de cerdos de genotipo Landrace francés, Landrace belga y Pietrain, Duee y col. (1980) encontraron un incremento en la concentración de algunos AA indispensables con el aumento del peso de sacrificio de los animales (lisina, treonina, fenilalanina y metionina), pero no hubo diferencias relacionadas con el genotipo. Aunque desconocemos la razón última de las diferencias detectadas entre genotipos en nuestro trabajo, estas podrían estar relacionadas con cambios en las proporciones relativas de las diferentes proteínas que componen la canal, los músculos u otros tejidos, que puedan diferir en su composición en aminoácidos. Aunque la composición en AA de la canal es sólo uno de los factores que influyen en las necesidades de AA en los animales, creemos que es necesario profundizar en el estudio de las necesidades de AA de cadena ramificada como la valina y la isoleucina, o los de fenilalanina, en el cerdo Ibérico, ya que podría conducir a una mejor utilización de la proteína de la dieta, y por consiguiente a mejoras en el crecimiento y desarrollo de los animales.

Efectos de la deficiencia de lisina en la composición en AA de las proteínas corporales

Anteriormente hemos comentado que para establecer las necesidades de nutrientes, se considera que el perfil en AA de las proteínas corporales permanece constante. Sin embargo, algunos estudios en cerdos indican que se pueden producir alteraciones en la composición de AA de los componentes corporales relacionados con cambios en el suministro de proteína y energía (Bikker y col., 1994), o en el peso corporal (Mahan y Shields, 1998). Más recientemente, Conde-Aguilera y col. (2010; 2014 y 2016) también han descrito cambios en el perfil de AA de la canal, órganos y músculos específicos en cerdos en crecimiento alimentados con dietas deficientes en aminoácidos azufrados. En nuestro trabajo, también hemos detectado que alimentar a los animales con una dieta deficiente en lisina afecta a la composición de AA de la proteína de la canal en cerdos jóvenes, de tipo graso y magro. La concentración de lisina disminuyó en un 13% en la proteína de la canal de los cerdos LDW, probablemente debido a que la escasez de lisina fue más severa para los cerdos convencionales que para los Ibéricos. En realidad, la velocidad de crecimiento disminuyó en los cerdos de ambos genotipos cuando se alimentaron con la dieta deficiente en lisina, pero el descenso fue mayor para los cerdos LDW.

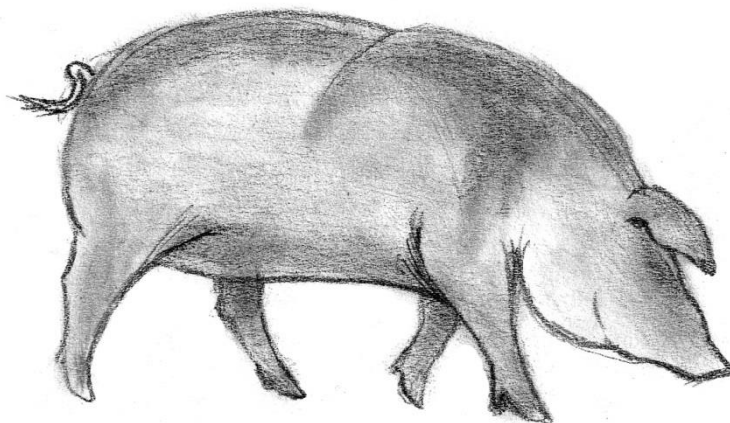
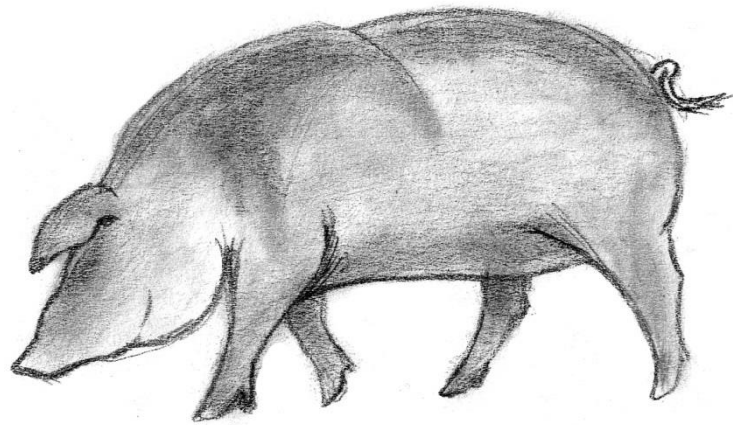
En el músculo *Longissimus dorsi* la reducción en la concentración de lisina afectó a ambos tipos de cerdos. Chang y Wei (2005), sin embargo, no encontraron cambios en la concentración de AA en la proteína de varios músculos (incluyendo *Longissimus dorsi*) de cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina, aunque la restricción de lisina empleada en este caso fue más leve que la de nuestro experimento.

La concentración de histidina disminuyó sólo en la proteína de la canal y en *Longissimus dorsi* de cerdos Ibéricos. Durante la degradación de las proteínas musculares parte de la histidina liberada no está disponible para la reutilización en la síntesis de proteína muscular debido a su metilación post-transcripcional, dando lugar a 3-metil-histidina, que se excreta en orina. En cerdos este compuesto se acumula en el músculo en forma del dipéptido balanina, en contraste con otras especies de mamíferos en la que si se produce una excreción proporcional a las tasas de degradación proteica muscular (Harris y Milne, 1981). La menor concentración de histidina en la canal y *Longissimus dorsi* de los cerdos Ibéricos alimentados con dietas deficientes de lisina podría relacionarse con un aumento en la velocidad de degradación proteica muscular. En Rivera-Ferre y col. (2005), se observó una drástica disminución de las tasas fraccionales de síntesis proteica en músculos de las cerdas Ibéricas y Landrace que recibieron dietas deficientes en lisina (Rivera-Ferre y col., 2005). Aunque en este trabajo no se determinó la degradación proteica muscular, los resultados obtenidos apuntan a un incremento en este parámetro. Otra posibilidad que pueda explicar la disminución de la concentración de histidina en la proteína muscular está relacionada con los cambios en las propiedades metabólicas de los músculos a los que puede dar lugar la deficiencia de lisina. Cornet y Bousset (1999) mostraron que la carnosina, un dipéptido que contiene histidina, era más abundante en los músculos de contracción rápida, como el *Longissimus dorsi*, en comparación con los músculos masetero o trapecio, de mayor metabolismo oxidativo, lo que sugiere un papel amortiguador de la carnosina en el descenso de pH producido por la contracción anaeróbica. De esta forma, la disminución de la concentración de histidina en *Longissimus dorsi* podría estar relacionada, con una reducción en su contenido en carnosina de acuerdo con el cambio hacia un metabolismo más oxidativo observado en este músculo cuando los cerdos fueron alimentados con una dieta deficiente en lisina, discutido anteriormente. Aunque el cambio se produjo tanto en cerdos Ibéricos como en los LDW, los Ibéricos mostraron una actividad oxidativa mucho más elevada.

La concentración de leucina disminuyó en la proteína de la canal y de *Longissimus dorsi* en cerdos de ambos genotipos alimentados con la dieta deficiente en lisina. También se registró un descenso en la concentración de leucina libre en plasma, junto con menores niveles de IGF-1 e insulina en los cerdos alimentados con dietas deficientes en lisina, como hemos comentado con anterioridad). Todos estos factores contribuirían a explicar la reducción en la síntesis proteica muscular cuando se limita la ingesta de lisina, observada en trabajos previos, ya que todos ellos estimulan positivamente la síntesis de proteína muscular a través de la vía de señalización mTOR (Miyazaki y Esser, 2009). Contrariamente a *Longissimus dorsi*, la composición de AA de *Biceps femoris*, particularmente la concentración de AA indispensables, no se vio afectada por la deficiencia de lisina, excepto por una tendencia a una menor concentración de lisina. Hay algunas diferencias en la composición de AA entre los músculos estudiados, *Biceps femoris* es más rico en AA indispensable en comparación con *Longissimus dorsi*. Las variaciones en la composición muscular y las respuestas frente a la restricción de lisina pueden estar relacionadas con diferencias en su función y propiedades metabólicas. *Longissimus dorsi* es un músculo postural predominantemente de contracción rápida, mientras que *Biceps femoris* es un músculo de tipo mixto (Andrés y col., 2001) involucrado en la locomoción. En ambos genotipos la respuesta a la deficiencia de lisina siguió un patrón similar: ambos músculos redujeron su crecimiento, pero sólo *Longissimus dorsi* cambió significativamente su concentración de proteína y su composición de aminoácidos, mientras que los cambios en la composición de *Biceps femoris* fueron bastante moderados. Este hallazgo concuerda con observaciones previas en cerdos y otras especies en las que se describe que los músculos de contracción predominantemente rápida parecen más susceptibles a las restricciones de nutrientes o a cambios en factores externos que los músculos con metabolismo más oxidativo (Kelly y Goldspink, 1982; Conde-Aguilera y col. 2016). También se ha sugerido que los músculos relacionados con la movilidad, que se desarrollan en fases más tempranas de la vida, son menos propensos a verse afectados por factores externos (como la escasez de nutrientes) que los músculos con mayores coeficientes de crecimiento alométrico, como el *Longissimus dorsi*, considerado un músculo de desarrollo tardío (Bee y col., 2007).

En conclusión, las diferencias encontradas en la concentración de algunos aminoácidos indispensables de la proteína de la canal y del músculo debidas al genotipo pueden indicar necesidades relativamente superiores de estos aminoácidos en los cerdos Ibéricos comparados con cerdos de genotipo magro, lo que merece una investigación más profunda en este área. Por otro lado, hemos encontrado que tanto los cerdos grasos como los magros respondieron, en términos generales, de manera similar a una deficiencia dietética de lisina, modificando la tasa de crecimiento corporal y muscular y modulando la composición proteica de algunos componentes específicos de la canal, con funciones biológicas diferentes.

RESUMEN Y CONCLUSIONES



RESUMEN

La raza porcina Ibérica se caracteriza por una baja eficiencia productiva, crecimiento más lento, limitado desarrollo muscular, y gran capacidad de acumulación de grasa corporal en comparación con las razas porcinas modernas. En parte de los trabajos desarrollados previamente por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral, se han establecido pautas nutricionales para la alimentación de esta raza, criada en pureza, en distintas fases productivas. En paralelo se han desarrollado estudios que aportan conocimientos que nos ayuden a explicar algunas de las peculiaridades metabólicas de esta raza autóctona, como los que se describen en esta memoria.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio comparado de diversos aspectos del metabolismo de aminoácidos y lípidos en el cerdo Ibérico y en una raza porcina convencional, con especial énfasis en el tejido muscular y en el análisis de los posibles mecanismos implicados que puedan explicar las diferencias entre genotipos. Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos: a) Determinar los efectos que la deficiencia en lisina de la dieta puede ejercer sobre el crecimiento, la composición corporal, las características bioquímicas del músculo y el perfil metabólico de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White en idénticas condiciones experimentales; b) analizar de forma comparada los principales mecanismos enzimáticos implicados en el depósito de grasa en el músculo y la canal; c) evaluar la composición nutricional y parámetros de calidad en músculos de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White en diferentes estadios de crecimiento, sometidos a idénticas condiciones nutricionales y de manejo; y d) estudiar las diferencias en el perfil de aminoácidos de la proteína corporal de cerdos Ibéricos y Landrace × Large-White, en condiciones de un aporte adecuado de aminoácidos o de deficiencia en lisina, y sus posibles consecuencias sobre la definición de un perfil proteico ideal para el cerdo Ibérico en crecimiento.

Para la consecución de los objetivos descritos se diseñaron dos experimentos. En el primero de ellos se investigaron, en un ensayo comparado, los efectos que la alimentación con dietas deficientes en lisina causa en cerdos Ibéricos y en un cruce

comercial convencional, manteniendo a ambos en idénticas condiciones experimentales desde los 10 a los 25 kg de peso. En concreto, se analizaron los efectos sobre el crecimiento y eficiencia de utilización del alimento, las características bioquímicas musculares -con especial énfasis en la concentración de grasa intramuscular y su perfil de ácidos grasos-, el perfil de metabolitos y hormonas en plasma, las características de la canal, y los mecanismos relacionados con la actividad y expresión de algunas de las enzimas lipogénicas más importantes. Además, se realizó un estudio de los efectos tanto del genotipo como de la deficiencia en lisina de la dieta sobre el perfil de aminoácidos de la proteína muscular y la canal.

En un segundo experimento se evaluaron las diferencias en la composición nutricional y el color instrumental en dos músculos -*longissimus thoracis* y *biceps femoris*- de cerdos Ibéricos y cerdos de genotipo convencional a los 50 kg y 115 kg de peso vivo, manteniendo a los animales bajo condiciones idénticas de nutrición y manejo.

En el **primer experimento**, utilizamos veintiocho machos castrados de 10 Kg de peso corporal, 14 de la raza Ibérica y 14 Landrace x Large-White (LDW), alojados individualmente en parques de 2m². Los animales fueron asignados al azar a una de las dos dietas experimentales empleadas siguiendo un diseño factorial 2 × 2 (2 razas × 2 dietas). Las dietas, isonitrogenadas e isoenergéticas, contenían 200 g PB/kg MS y 14,7 MJ EM/kg MS y diferían en su contenido en lisina. La dieta adecuada en lisina (1,09% lisina) presentaba cantidades adecuadas en aminoácidos y en el resto de nutrientes, mientras que la dieta deficiente en lisina tenía una composición idéntica a la primera excepto por su aporte en lisina (0,52% lisina). Los animales fueron alimentados a 0,85 × la ingesta *ad libitum* del genotipo Ibérico, que presenta mayor capacidad de ingesta. La ingesta diaria fue calculada semanalmente en función del peso vivo individual. Cuando los animales alcanzaron 25 kg de peso corporal, se sacrificaron por exsanguinación previa electronarcosis.

Los datos proporcionados por este ensayo nos indican que el crecimiento se redujo en ambos genotipos porcinos cuando se les alimentó con dietas deficientes en lisina, particularmente en los cerdos LDW. En general, la restricción en lisina produjo un descenso en el peso relativo de tejidos magros como lomo, jamón y paleta, así como en la concentración de proteína en la canal, a la vez que condujo a un aumento del peso relativo de los depósitos grasos. Respecto a los músculos estudiados,

longissimus dorsi y *biceps femoris*, en ambos se redujo la concentración de proteína y aumentó el contenido de grasa intramuscular en los animales alimentados con la dieta deficiente en lisina, aunque este incremento no resultó significativo en el caso del *longissimus dorsi* de los cerdos LDW. En la grasa intramuscular la concentración de ácido oleico aumentó y la de ácidos grasos poliinsaturados disminuyó significativamente en los músculos de los animales alimentados con la dieta deficiente en lisina. En estos animales se observó, además, un incremento en la proporción de fibras oxidativas en el *longissimus dorsi*, así como un incremento en la concentración de L-carnitina libre en ambos músculos.

En cuanto a la actividad de las enzimas lipogénicas estudiadas: ácido graso sintasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y enzima málica, la deficiencia en lisina promovió un aumento generalizado de su actividad en ambos músculos, y un descenso de la misma en el caso del tejido adiposo subcutáneo. Este aumento de actividad se corresponde, en líneas generales, con los cambios en expresión génica de estas enzimas observados en los mismos tejidos.

El análisis de metabolitos y hormonas en plasma mostró menor concentración de creatinina, y mayores de leptina e IGF-1 en los cerdos Ibéricos respecto a los LDW; así como un incremento en las concentraciones de urea y colesterol total, y una disminución de insulina e IGF-1, en los animales alimentados con la dieta deficiente en lisina. La concentración plasmática de L-carnitina libre fue superior en los cerdos Ibéricos, aunque no se observaron cambios en la concentración plasmática de este compuesto relacionados con la disminución en la ingesta de lisina.

En el **segundo experimento** se emplearon 32 cerdos machos castrados, 16 Ibéricos puros y 16 Landrace x Large-White (LDW), alojados individualmente en parques de 2m². Los animales de cada genotipo se asignaron al azar a una de las dos dietas experimentales empleadas siguiendo un diseño factorial 2 × 2, con 8 animales por combinación de tratamientos. Las dietas utilizadas proporcionaron 17 y 13% de proteína bruta, respectivamente, y contenían concentraciones similares en el resto de nutrientes y energía (14,5 MJ/kg). Los animales se alimentaron a 0,80 × la ingesta *ad libitum* del genotipo Ibérico, con mayor capacidad de ingesta. La ingesta diaria fue calculada semanalmente en función del peso vivo individual. Cuatro animales por tipo genético y dieta se sacrificaron a 50 y 115 kg de peso, respectivamente, por exanguinación previa electronarcosis. Inmediatamente tras el sacrificio se extrajeron

muestras de los músculos *longissimus thoracis* y *biceps femoris* para el análisis de su composición en nutrientes y color instrumental.

En este experimento se observó que los músculos del cerdo Ibérico, a los dos pesos de sacrificio estudiados, contenían mayor concentración de grasa intramuscular, con un contenido más elevado en ácidos grasos monoinsaturados, especialmente en ácido oleico, al compararlos con los del genotipo LDW. Entre los minerales estudiados, destacaron el Fe y Zn. Cuando los animales tenían un peso de 115 kg los músculos de cerdo Ibérico presentaron mayor concentración de estos dos minerales, especialmente el *bíceps femoris*, con valores de hasta 17,5 mg de Fe/kg y 28,6 mg de Zn/kg frente a los 9,6 mg de Fe/kg y 17,7 mg de Zn/kg encontrados en el cruce LDW. Estos resultados muestran que la carne de cerdo Ibérico puede considerarse una fuente rica en estos minerales. Los músculos de cerdo Ibérico fueron, además, más oscuros (coordenada L* inferior) y más rojizos (valor a* superior) que los de cerdos LDW, que a su vez mostraron tonos más cercanos al amarillo (b* mayor). Se encontraron correlaciones significativas entre las coordenadas de color, el contenido de minerales y el perfil lipídico de los músculos: el color rojo del músculo se relacionó principalmente con los niveles de Fe, Zn y con los ácidos grasos monoinsaturados, mientras que el color amarillo se relacionó positivamente con el Cu, los ácidos grasos poliinsaturados y el ácido linoleico. Los resultados obtenidos en este ensayo apoyan resultados previos sobre las características particulares de los músculos del cerdo Ibérico, que están relacionadas con la calidad de la carne y de los productos derivados de esta raza de tendencia grasa comparada con las razas convencionales, incluso bajo un sistema de manejo idéntico, debido a su composición en ácidos grasos y parámetros de color.

Por otra parte, el **primer experimento** descrito permitió, además, analizar la composición en aminoácidos de la proteína de los músculos y canal, y obtener información sobre posibles diferencias en el perfil de aminoácidos esenciales de ambos genotipos y de su respuesta ante cambios en la concentración de lisina en la dieta. En la proteína de la canal de cerdos Ibéricos se observó una concentración superior de isoleucina, valina y fenilalanina (5-9%) en comparación con la de cerdos LDW, mientras que las de treonina y metionina tendieron a ser más bajas. Para el músculo *longissimus dorsi*, se observaron concentraciones más altas (4,6 a 7,5%) de arginina, isoleucina, fenilalanina, lisina y valina; y menores de metionina (7,2%) en los

cerdos Ibéricos, con cambios significativos en las concentraciones de varios aminoácidos en ambos genotipos porcinos cuando se alimentó a los cerdos con la dieta deficiente en lisina. Por el contrario, los efectos del genotipo y la deficiencia en lisina de la dieta sobre la composición en aminoácidos de la proteína del músculo *bíceps femoris* fueron bastante moderados. Las diferencias entre genotipos detectadas en la composición de aminoácidos de las proteínas corporales pueden tener relevancia para la definición de un perfil de aminoácidos esenciales óptimo para el cerdo Ibérico en crecimiento, de cara a aumentar su eficiencia de utilización proteica de la dieta.

CONCLUSIONES

1. Tanto los cerdos Ibéricos como los de genotipo convencional respondieron en términos generales de manera similar al aporte deficiente de lisina en la dieta. Se produjo un descenso en el ritmo de crecimiento corporal y muscular, junto con un aumento en el peso relativo de los depósitos grasos y un descenso en el de los componentes magros.

2. El contenido y la composición de la grasa intramuscular pueden ser manipulados modificando la concentración de lisina en la dieta de cerdos de tipo convencional y graso, como el Ibérico. Las estrategias necesarias para lograr un nivel determinado de grasa intramuscular sin penalizar el crecimiento del animal dependerán del genotipo y de la fase productiva del mismo.

3. Los parámetros de actividad y expresión génica de las principales enzimas lipogénicas en los músculos estudiados permiten explicar, al menos en parte, la mayor concentración de grasa intramuscular que presentan los cerdos Ibéricos, así como el incremento en este parámetro que tiene lugar cuando los animales reciben una dieta deficiente en lisina.

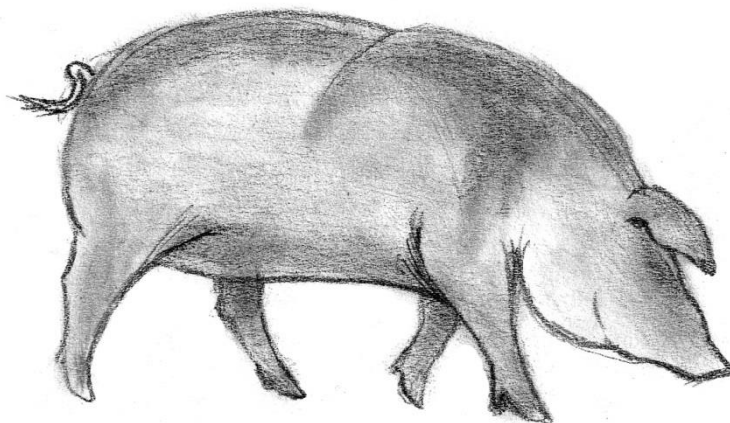
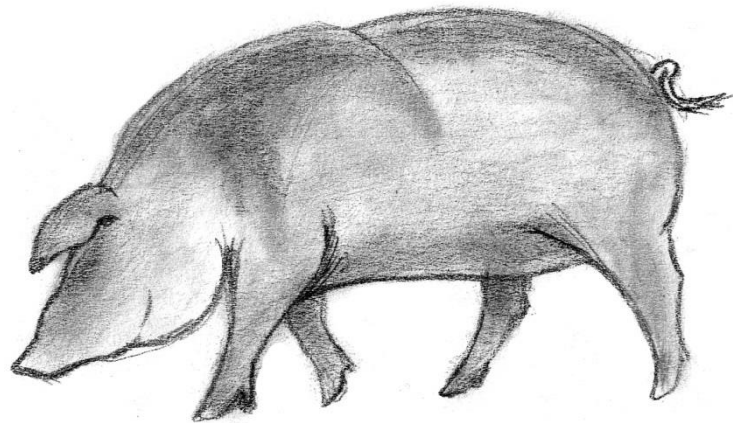
4. El genotipo ejerce una gran influencia sobre la composición y características del músculo íntimamente relacionadas con la calidad de la carne, como su contenido en grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos, la composición mineral y el color.

5. Existen correlaciones significativas entre las coordenadas de color, el contenido en minerales traza y la composición en ácidos grasos de los músculos. El color rojo se relacionó positivamente con los niveles de Fe, Zn y de ácidos grasos monoinsaturados, mientras que el color amarillo lo hizo con las concentraciones de Cu y ácidos grasos poliinsaturados.

6. Las diferencias encontradas entre genotipos en la concentración de algunos aminoácidos de las proteínas corporales pueden indicar que el perfil de la proteína ideal para el cerdo Ibérico en crecimiento puede diferir en algunos aminoácidos esenciales, como la valina, isoleucina y metionina, respecto al definido para cerdos convencionales.

7. La deficiencia de lisina en la dieta afecta a la composición proteica muscular, con efectos distintos sobre músculos con funciones biológicas diferentes, lo que nos muestra la plasticidad del organismo animal para hacer frente a condiciones de restricción de nutrientes.

SUMMARY AND CONCLUSIONS



SUMMARY

The Iberian pig is a porcine breed characterized by low performance, slower growth, limited capacity for lean tissue accretion and high fat deposition rates compare to lean porcine breeds. In part of the studies developed previously by our research group, nutritional guidelines have been established for feeding of this breed -reared in purity- at different productive stages. In addition, other studies have been carried out to contribute to explaining some of the metabolic peculiarities of this autochthonous breed, such as those described in this Doctoral Thesis.

The main objective of this Doctoral Thesis was to study, by comparative trials, various aspects of amino acid and lipid metabolism in Iberian pigs and in a conventional swine breed, particularly on muscle tissue, and on the analysis of possible mechanisms involved which could explain differences between genotypes. To achieve this general objective, the following specific objectives were proposed: a) To determine the effects of dietary lysine deficiency on growth rate, body composition, muscle biochemical characteristics and metabolic profile of Iberian and Landrace × Large-White pigs maintained in identical experimental conditions; b) to analyze, in a comparative assay, the main enzymatic mechanisms involved in the deposition of fat in muscle and carcass; c) to evaluate the nutritional composition and quality parameters in muscles of Iberian and Landrace × Large-White pigs at different stages of growth, reared under similar nutritional and management conditions; and d) to study differences on the amino acid profile of body proteins of Iberian and Landrace × Large-White pigs under conditions of adequate or deficient lysine supply, and their possible consequences on the definition of an optimum dietary protein profile for Iberian growing pig.

Two experiments were designed to achieve the described objectives. In the first one, the effects of lysine deficient diets on Iberian pigs and on a conventional crossbreed were investigated in a comparative trial, rearing in similar experimental conditions from 10 to 25 kg of body weight (BW). In particular, we analyzed the effects on growth rate and feed efficiency, the biochemical characteristics of the muscles - with special emphasis on the content and composition of intramuscular fat - the profile of plasma metabolites and hormones, characteristics of carcass, and

mechanisms associated to the activity and expression of some of the most important lipogenic enzymes in tissues. In addition, a study of the effects of both genotype and dietary lysine deficiency on the amino acid profile of muscle and carcass protein was performed. In a second experiment, differences on nutritional composition and instrumental color in two muscles (*longissimus thoracis* and *biceps femoris*) of Iberian and conventional pigs breed at 50 kg and 115 kg BW were evaluated under identical conditions of nutrition and management.

In the **first experiment**, twenty-eight castrated males of 10 kg BW were used, 14 Iberian barrows, and 14 Landrace x Large-White (LDW) barrows. Pigs were housed in individual pens of 2 m². Animals from both breeds were randomly assigned to each of two experimental diets in a 2 × 2 factorial arrangement (2 breeds × 2 diets). Diets were isonitrogenous and isoenergetic, containing 200 g CP/kg DM and 14.7 MJ ME/kg DM and differed in lysine content. The lysine adequate diet contained sufficient amounts of amino acids and rest of nutrients (1.09% lysine), and the lysine deficient diet was of identical composition except for the lysine content (5.2 g Lys/kg). Animals were fed at 0.85 × *ad libitum* intake of the Iberian genotype, which shows greater intake capacity. Daily intake was calculated weekly according to individual body weight. Animals were slaughtered at 25 kg BW by exsanguination after electrical stunning.

Growth rate was reduced in both genotypes fed the lysine deficient diet, particularly in LDW pigs. In general, lysine restriction resulted in a decrease in the relative weight of lean components as loin, ham and shoulder, as well as in carcass protein concentration, meanwhile the relative weight of fatty components increased. In regard to the muscles studied (*longissimus dorsi* and *biceps femoris*) in both, protein concentration was reduced and intramuscular fat content increased in animals fed lysine the deficient diet, although this increase was not significant in the case of *longissimus dorsi* of LDW pigs.

Oleic acid and polyunsaturated fatty acid proportions increased and decreased, respectively, in Intramuscular fat of both muscles of animals fed the lysine deficient diet. In these animals, an increment in the proportion of oxidative fibers in *longissimus dorsi* was observed, as well as an increase in free L-carnitine concentration of both muscles.

Regarding the activity of the lipogenic enzymes studied: fatty acid synthase, glucose- 6- phosphate dehydrogenase, and malic enzyme, lysine deficiency promoted a general increase of activity in both muscles; on the contrary, a decrease was observed in lipogenic activity in the case of subcutaneous adipose tissue. The increase in enzymatic activities corresponds, in general terms, with changes observed on gene expression of these enzymes in the same tissues.

Analysis of plasma metabolites and hormones showed lower creatinine concentration, and higher leptin and IGF-1 levels in Iberian pigs compared with LDW pigs. An increase of urea and total cholesterol concentrations and a decrease of insulin and IGF-1 levels were detected in pigs fed the lysine deficient diet. Plasma free L-carnitine concentration was higher in Iberian pigs than in LDW pigs, although no changes in plasma L-carnitine concentration due to dietary lysine supply were detected.

In the **second experiment**, 32 male castrated pigs were used, 16 pure Iberian and 16 Landrace x Large-White (LDW), housed in individual pens of 2 m². Animals of each genotype were fed one of the two experimental diets in a 2 × 2 factorial arrangement of treatments, with 8 animals per treatment combination. The diets provided 17 and 13% crude protein, respectively, and contained similar concentrations in the rest of nutrients and energy (14.5 MJ ME/kg). Pigs were fed at 0.80 × *ad libitum* intake of the Iberian genotype, which has higher intake capacity. Daily intake was calculated weekly according to individual BW. Four animals per genetic type and diet were slaughtered at 50 and 115 kg BW, respectively, by exsanguination after electrical stunning. Immediately after slaughter, samples of muscles *longissimus thoracis* and *biceps femoris* were dissected and stored to further analyse their nutritional composition and instrumental colour.

The muscles of Iberian pigs contained higher amounts of intramuscular fat and monounsaturated fatty acids, particularly oleic acid, than those from LDW genotype. Iron and Zn stand out among the minerals studied. At 115 kg BW, muscles of Iberian pigs presented higher concentration of these two minerals, with values of 17.5 mg Fe / kg and 28.6 mg Zn / kg, respectively, compared with 9.6 mg Fe / kg and 17.7 mg Zn / kg, found in LDW animals. These results show that meat from Iberian pigs may be a valuable source of these minerals. Additionally, higher red color (*a* * value), and lower colour saturation (lower hue angle) were observed in muscles of Iberian pigs than in

those from LDW pigs. Significant correlation between colour coordinates, mineral content and the lipid profile of muscles were found: redness was mainly linked to Fe, Zn and monounsaturated fatty acids levels; whereas yellowness was positively related with Cu, polyunsaturated fatty acids, and linoleic acid level. The results of the present study support that muscles from the Iberian pig genotype have special characteristics which may enhance the overall quality of meat compared with conventional or high-lean porcine breeds, even under identical management system, due to its particular fat composition and colour attributes.

In addition, the **first experiment** described allowed us to assess the amino acid composition of muscle and carcass protein, and to study possible differences on essential amino acid profile of both pig genotypes and their responses to changes in lysine supply. Concentration of isoleucine, valine and phenylalanine were higher (5 to 9%) in carcass protein of Iberian pigs compared with LDW pigs, and of those of threonine and methionine tended to be lower in the former. For *longissimus dorsi* muscle, higher concentrations of arginine, isoleucine, phenylalanine, lysine and valine (4.6 to 7.5%); and lower of methionine (7.2%) were observed in Iberian pigs. In both pig genotypes, significant changes on concentrations of several amino acids of *longissimus dorsi* protein were detected when pigs were fed the lysine deficient diet. In contrast, the effects of genotype and dietary lysine deficiency on the amino acid composition of the biceps femoris muscle protein were rather moderate. The breed differences detected on amino acid composition of body protein may have relevance for definition of an optimum dietary pattern of indispensable amino acid for Iberian growing pigs, helping to improve their performance and efficiency of dietary protein utilization.

CONCLUSIONS

1. Both fatty and lean pigs responded in general terms in a similar way to a dietary lysine deficiency, modifying the rate of body and muscle growth, with an increase in the relative weight of fat depots and a decrease in lean carcass components.

2. Intramuscular fat content and composition can be manipulated by reducing dietary lysine concentration in the dietary protein of lean and fatty pigs. Best time schedule and extension of lysine deficiency treatment will depend on genotype and productive phase to avoid penalty on rates of growth.

3. The activity and gene expression of the main lipogenic enzymes studied in muscle allow explaining, at least partially, the responses in muscle intramuscular fat to a lysine deficiency diet, and genotype differences regarding this parameter.

4. Pig genotype have a major influence on muscle biochemical characteristics related to meat quality as concentration and fatty acid profile of intramuscular fat, mineral composition and color.

5. Correlations among instrumental color, mineral content and fatty acid composition in pig muscle were found. Red color was positively correlated to Fe, Zn and monounsaturated fatty acids, whereas yellowness was positively correlated with Cu and polyunsaturated fatty acid levels.

6. The breed differences found in concentration of some amino acids of body proteins may indicate that the profile of ideal protein for Iberian growing pigs may differ in some indispensable amino acids like isoleucine, valine and methionine from those established for conventional pig types.

7. Lysine deficiency affects muscle protein composition showing different effects on muscle with distinct biological functions, indicating that pig organism can modulate composition of body components to face lack of essential nutrients.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3tres3iberico 2017. https://www.3tres3iberico.com/buscando/evolucion-de-los-principales-indices-tecnicos-del-conjunto-de-explotac_1230. Accedido en Octubre de 2017
- AECERIBER, Asociación española de criadores de ganado porcino selecto Ibérico puro y tronco Ibérico. 2007. Manual de Cerdo Ibérico. 2ª Edición.
- AECERIBER, Asociación española de criadores de ganado porcino selecto Ibérico puro y tronco Ibérico. 2011. Programa de mejora de la raza porcina Ibérica. INIA.
- Ajimoto 2013. Ideal amino acid profile for piglets. Ajinomoto- Eurolysine S. A. S. París Cedex, Francia.
- Alasnier C, Réminon H, Gandemer G 1996. Lipid characteristics associated with oxidative and glycolytic fibres in rabbit muscles. *Meat Science* 43, 213-224.
- Andrés AI, Cava R, Mayoral AI, Tejeda JF, Morcuende D, Ruiz J 2001. Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. *Meat Science* 59, 39-47.
- Andrés AI, Ruiz J, Mayoral AI, Tejeda JF, Cava R 2000. Influencing of rearing conditions and crossbreeding on muscle colour in Iberian pigs. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie* 6, 315–321.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemist. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemist. 2003. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 17th ed. 2nd revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Arrebola F, Pelayo A 2016. Manejo de porcino ibérico en dehesa. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
- Ayuso M, Fernández A, Isabel B, Rey A, Benítez R, Daza A, López-Bote CJ, Óvilo C 2015. Long term vitamin A restriction improves meat quality parameters and modifies gene expression in Iberian pigs. *Journal of Animal Science* 93, 2730–2744.
- Azain MJ 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *Journal of Animal Science* 82, 916–924.
- Baillie AG, Garlick PJ 1991. Responses of protein synthesis in different skeletal muscles to fasting and insulin in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 260, 891-896.
- Barea R, Isabel B, Nieto R, López-Bote C, Aguilera JF 2013. Evolution of the FA profile of subcutaneous adipose tissue in IB and Landrace×Large White pigs at growing and fattening stages. *Animal* 7, 688-698.

- Barea R, Nieto R, Aguilera JF 2007. Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal* 1, 357-365.
- Barea R, Nieto R, Lara L, García MA, Vílchez MA, Aguilera JF 2006. Effects of dietary protein content and feeding level on carcass characteristics and organs weights of Iberian pigs growing between 50 and 100kg live weight. *Animal Science* 82, 405-413.
- Barea R, Nieto R, Vitari F, Domeneghini C, Aguilera JF 2011. Effects of pig genotype (Iberian vs. Landrace × Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal* 5, 547–557.
- Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM, Jongman EC, Hutson GD 2001. A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing. *Australian Journal of Agricultural Research* 52, 1-28.
- Bazin R, Ferre P 2001. Assays of lipogenic enzymes. *Methods in Molecular Biology* 155, 121–127. PMID:11293064
- Bee G 2007. Birth weight of litters as a source of variation in postnatal growth, and carcass and meat quality. *Age* 6, 10.
- Bee G, Calderini M, Biolley C, Guex G, Herzog W, Lindemann MD 2007. Changes in the histochemical properties and meat quality traits of porcine muscles during the growing-finishing period as affected by feed restriction, slaughter age, or slaughter weight. *Journal of Animal Science* 85, 1030-1045.
- Bee G, Solomon MB, Czerwinski SM, Long C, Pursel VG 1999. Correlation between histochemically assessed fiber type distribution and isomyosin and myosin heavy chain content in porcine skeletal muscles. *Journal of Animal Science* 77, 2104-2111.
- Benevenga NJ, Blemings KP 2007. Unique aspects of lysine nutrition and metabolism. *The Journal of Nutrition* 137, 1610-1615.
- Bidner BS, Ellis M, Witte DP, Carr SN, McKeith FK 2004. Influence of dietary lysine level, pre-slaughter fasting, and rendement napole genotype on fresh pork quality. *Meat Science*, 68, 53-60.
- Bikker P, Verstegen MW, Bosch MW 1994. Amino Acid Composition of Growing Pigs Is Affected by Protein and Energy Intake. *The Journal of Nutrition* 124, 1961-1969
- Biomodel 2017. <http://biomodel.uah.es/model2/lip/acgr-carnitina.htm>. Accedido en Octubre de 2017
- Blachier F, Wu G, Yin Y, Hou Y, Andriamihaja M 2013. Developmental amino acid metabolism in the pig small and large intestine epithelial cells. In *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*, pp. 59-74. Springer Vienna.

- Blogia 2.0. 2017. <http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2016/04/el-sistema-muscular-i.html>.
Accedido en Octubre de 2017
- Boisen S, Hvelplund T, Weisbjerg MR 2000. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock Production Science* 6, 239-251.
- Boletín Oficial Del Estado. 2013. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE-A-2013-1337.
- Boletín Oficial del Estado. 2014. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibérico. BOE-A-2014-318.
- Boletín Oficial del Estado. 2016. Resolución de 15 de marzo de 2016, de la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, por la que se publica la de 10 de marzo de 2016, por la que se aprueba la reglamentación específica del libro genealógico de la raza porcina Ibérica. BOE-A-2016-3264.
- Boletín Oficial del Estado. Aragón. 1993. Orden de 29 de julio de 1993, del Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Jamón de Teruel" y su Consejo Regulador. BOE-A-1993-19267.
- Bosch L, Tor M, Reixach J, Estany J 2012. Age-related changes in intramuscular and subcutaneous fat content and fatty acid composition in growing pigs using longitudinal data. *Meat Science* 91, 358- 363.
- Braude R, Fulford RJ, Mitchell KG, Myres AW, Porter JWG 1974. Performance and blood plasma amino acid and urea concentrations in growing pigs given diets of cereals and groundnut meal and supplemented with graded amounts of L-lysine. *Livestock Production Science* 1, 383-400.
- Breier BH 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domestic animal Endocrinology* 17, 209-218.
- Bressan MC, Almeida J, Santos Silva J, Bettencourt C, Francisco A, Gama LT 2016. Carcass characteristics and fat depots in Iberian and F Large Whitex Landrace pigs intensively finished or raised outdoors in oak-tree forests. *Journal of Animal Science* 94, 2592-2602.
- Brewer MS, Jensen J, Prestat C, Zhu LG, McKeith FK 2002. Visual acceptability and consumer purchase intent of enhanced pork loin roasts. *Journal of Muscle Foods* 13, 53-68.
- Bröer S 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews* 88, 249-286.
- Brooks CC 1971. Fatty acid composition of pork lipids as affected by basal diet, fat source and fat level. *Journal of Animal Science* 33, 1224-1231.

- Brosnan JT 2001. Amino Acids, Then and Now--A Reflection on Sir Hans Krebs' Contribution to Nitrogen Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 276, 265-270.
- BSAS, British Society of Animal Science. 2003. Nutrient requirement standards for pigs. Penicuik, UK.
- Buonomo FC, Baile CA 1990. The neurophysiological regulation of growth hormone secretion. *Domestic Animal Endocrinology* 7, 435-450.
- Cameron ND, Enser M, Nute GR, Whittington FM, Penman JC, Fisker AC, Perry AM, Wood JD 2000. Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science* 55, 187-195.
- Cameron ND, Enser MB 1991. Fatty acid composition of lipid in Longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality. *Meat Science* 29, 295-307.
- Candek-Potokar M, Monin G, Zlender B 2002. Pork quality, processing, and sensory characteristics of dry-cured hams as influenced by Duroc crossing and sex. *Journal of Animal Science* 80, 988-996.
- Canh TT, Aarnink AJA, Schutte JB, Sutton A, Langhout DJ, Verstegen MWA 1998. Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing-finishing pigs. *Livestock Production Science* 56, 181-191.
- Carrapiso AI, Garcia C 2005 Instrumental colour of Iberian ham subcutaneous fat and lean (biceps femoris): Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science* 71, 284-290.
- Castell AG, Ciplef RL, Poste-Flynn LM, Butler G 1994. Performance, carcass and pork characteristics of castrates and gilts self-fed diets differing in protein content and lysine: energy ratio. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 519-528.
- Castellano R, Perruchot MH, Conde-Aguilera JA, van Milgen J, Collin A, Tesseraud S, Mercier Y, Gondret F 2015. A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. *PloS one* 10, e0130514.
- Cava R, Ruiz J, Ventanas J, Antequera T 1999. Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science* 52, 165-172.
- Cava R, Ventanas J, Tejada JF, Ruiz J, Antequera T 2000. Effect of free-range rearing and alpha-tocopherol and copper supplementation on fatty acid profiles and susceptibility to lipid oxidation of fresh meat from Iberian pigs. *Food Chemistry* 68, 51-59.
- Cederblad G, Bylund AC, Holmand J, Scherstén T 1976. Carnitine concentration in relation to enzyme activities and substrate utilization in human skeletal muscles. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 36, 547-552.

- Cervantes-Ramírez M, Méndez-Trujillo V, Araiza-Piña BA, Barrera-Silva MA, González-Mendoza D, Morales-Trejo A 2013. Supplemental leucine and isoleucine affect expression of cationic amino acid transporters and myosin, serum concentration of amino acids, and growth performance of pigs. *Genetics and Molecular Research* 12, 115-126.
- Chang HC, Seidman I, Teebor G, Lane MD 1967. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28, 682-686.
- Chang YM, Wei HW 2005. The effects of dietary lysine deficiency on muscle protein turnover in postweanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 1326-1335.
- Channon HA, Kerr MG, Walker PJ 2004. Effect of Duroc content, sex and ageing period on meat and eating quality attributes of pork loin. *Meat Science* 66, 881-888.
- Chung TK, Baker DH 1992. Efficiency of dietary methionine utilization by Young pigs. *The Journal of Nutrition* 122, 1862-1869.
- Cilla I, Altarriba J, Guerrero L, Gispert M, Martínez L, Moreno C, Beltrán JA, Guàrdia MD, Diestre A, Arnau J 2006. Effect of different Duroc line sires on carcass composition, meat quality and dry-cured ham acceptability. *Meat Science* 72, 252-260
- Clemente I, Membrillo A, Azor P, Dorado G, Rodero A, Molina A 2006. Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino ibérico: una propuesta integradora. *Solo Cerdo Ibérico* 16, 7-23.
- Clowes EJ, Aherne FX, Baracos VE 2005. Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288, 564-572.
- Coeffier M, Marion R, Ducrotte P, Dechelotte P 2003. Modulating effect of glutamine on IL-1 β -induced cytokine production by human gut. *Clinical Nutrition* 22, 407-413.
- Cohen SA, Meys M, Tarvin TL 1989. The Pico-Tag method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corporation, Bedford, MA
- Coma J, Carrion D, Zimmerman DR 1995. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs. *Journal of Animal Science* 73, 472-481.
- Conde-Aguilera JA, Aguinaga MA, Aguilera JF, Nieto R 2011. Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with different protein concentrations. *Journal of Animal Science* 89, 754-763.
- Conde-Aguilera JA, Barea R, Le Floc'h N, Lefaucheur L, van Milgen J 2010. A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal* 4, 1349-1358.

- Conde-Aguilera JA, Cobo-Ortega C, Mercier Y, Tesseraud S, van Milgen J 2014. The amino acid composition of tissue protein is affected by the total sulfur amino acid supply in growing pigs. *Animal* 8, 401-409.
- Conde-Aguilera JA, Lefaucheur L, Tesseraud S, Mercier Y, Le Floc'h N, van Milgen J 2016. Skeletal muscles respond differently when piglets are offered a diet 30% deficient in total sulfur amino acid for 10 days. *European Journal of Nutrition* 55, 117-126.
- Cornet M, Bousset J 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between red and white muscles. *Meat Science* 51, 215-219
- Curthoys NP, Watford M 1995 Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual review of nutrition* 15, 133-159.
- Cynober LA 2002. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 18, 761-766.
- da Costa N, McGillivray C, Bai Q, Wood JD, Evans G, Chang KC 2004. Restriction of dietary energy and protein induces molecular changes in young porcine skeletal muscles. *The Journal of Nutrition* 134, 2191-2199.
- Damon M, Louveau I, Lefaucheur L, Lebret B, Vincent A, Leroy P, Sanchez MP, Herpin P, Gondret F 2006. Number of intramuscular adipocytes and fatty acid binding protein-4 content are significant indicators of intramuscular fat level in crossbred Large White × Duroc pigs. *Journal of Animal Science* 84, 1083-1092.
- Davila AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y, Tomé D 2013. Re-print of “Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host”. *Pharmacological Research* 69, 114-126.
- Daza A, Latorre MA, López-Bote JC 2012. The effect of granulated barley as single major ingredient in the growing or finishing diet on productive performance, carcass, meat and fat quality of heavy pigs. *Animal* 6, 1543-1553
- Daza A, Rey AI, Menoyo D, Bautista JM, Olivares A, López-Bote CJ 2007. Effect of level of feed restriction during growth and/or fattening on fatty acid composition and lipogenic enzyme activity in heavy pigs. *Animal Feed Science and Technology* 138, 61-74.
- de Blas C, Mateos GG, García Rebollar P, editors 2010. *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. 3rd ed. (In Spanish.) Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, Spain.
- Deng ZY, Zhang JW, Wu GY, Yin Y, Ruan Z, Li TJ, Chu WY, Kong XF, Zhang YZ, Fan YW, Rong Liu R, Huang RL 2007. Dietary supplementation with polysaccharides from Semen cassiae enhances immunoglobulin production and interleukin gene expression in early-weaned piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1868-1873.

- Dong XY, Xu J, Tang SQ, Li HY, Jiang QY, Zou XT 2009. Ghrelin and its biological effects on pigs. *Peptides* 30, 1203-1211
- Doran O, Moule SK, Teye GA, Whittington FM, Hallett KG, Wood JD 2006. A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formations. *British Journal of Nutrition* 95, 609–617.
- Duee PH, Calmes R, Desmoulin B 1980. Composition en acides aminés des protéines musculaires du porc selon le type génétique. In *Annales de zootechnie* 29, 31-37.
- Dwyer CM, Stickland NC 1991. Sources of variation in myofibre number within and between litters of pigs. *Animal Production* 52, 527-533.
- Dwyer CM, Stickland NC, Fletcher JM 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *Journal of Animal Science* 72, 911-917.
- Enser M, Hallett K, Hewitt B, Fursey GAJ, Wood JD 1996. Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Science* 42, 443–456.
- Enser M, Richardson RI, Wood JD, Gill BP, Sheard PR 2000. Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Science* 55, 201–212.
- Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA 2006. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290, E612-E621.
- Essen-Gustavsson B, Karlsson A, Lundström K, Enfält AC 1994. Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Science* 38, 269-277.
- Evonik 2011. Amino acid recommendation software (J. Htoo). Aminopig 1.0. Evonik Industries AG. Animal Nutrition Services. Hanao-Wolfgang, Alemania.
- FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 2006. Necesidades nutricionales para ganado porcino. Normas FEDNA. 1ª Edición. Madrid
- FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 2013. Necesidades nutricionales para ganado porcino. Normas FEDNA. 2ª Edición. Madrid
- FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 2010. Tablas de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Normas FEDNA 3ª Edición. Madrid.

- Fekkes D, Voskuilen-Kooyman A, Jankie R, Huijmans J 2000. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 744, 183-188.
- Fernandez X, Monin G, Talmant A, Mourot J, Lebret B 1999. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat—1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Science* 53, 59-65.
- Fernández-Figares I, Lachica M, Nieto R, Rivera-Ferre MG, Aguilera JF 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science* 110, 73-81.
- Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, Ceconi C 2004. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033, 79–91
- Finot PA 2005. The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *Journal of AOAC International* 88, 894-903.
- Fischer M, Hirche F, Kluge H, Eder K 2009. A moderate excess of dietary lysine lowers plasma and tissue carnitine concentrations in pigs. *British Journal of Nutrition* 101, 190-196.
- Fitch WM, Hill R, Chaikoff IL 1959. The effect of fructose feeding on glycolytic enzyme activities of the normal rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 234, 1048-1051.
- Flodin NW 1997. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. *Journal of the American College of Nutrition* 16, 7-21.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Font-i-Furnols M, Tous N, Esteve-Garcia E, Gispert M 2012. Do all the consumers accept marbling in the same way? The relationship between eating and visual acceptability of pork with different intramuscular fat content. *Meat Science* 91, 448-453.
- Freire JPB, Mourot J, Cunha LF, Almeida JAA, Aumaitre A 1998. Effect of the source of dietary fat on postweaning lipogenesis in lean and fat pigs. *Annals of Nutrition and Metabolism* 42, 90-95.
- Friesen KG, Nelssen JL, Goodband RD, Tokach MD, Unruh JA, Kropf DH, Kerr BJ 1995. The effect of dietary lysine on growth, carcass composition, and lipid metabolism in high-lean growth gilts fed from 72 to 136 kilograms. *Journal of Animal Science* 73, 3392-3401.
- Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W, Spencer TE, Carroll RJ, Meininger CJ, Wu G 2005. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of Nutrition* 135, 714-721.

- Fuentes V, Ventanas S, Ventanas J, Estévez M 2014. The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: purebred Iberian versus reciprocal Iberian x Duroc crossbred pigs. *Meat Science* 96, 737-743.
- Fuller MF 1991. Present knowledge of amino acid requirements for maintenance and production: non-ruminants. En: *Protein Metabolism and Nutrition*, EAAP pub. nº 59, vol 1, pág. 116-126, (Editores, Eggum, B.O., Boisen, S., Borsting, C., Danfaer, A., Hvelplund T.), pág. 155-184.
- Fuller MF 1994. Amino acid requirements for maintenance, body protein accretion and reproduction in pigs. En: *Amino acids in Farm Animal Nutrition*, CAB International, pág. 155-184, (Editor, D'Mello, J.P.F.).
- Fuller MF, Reeds PJ 1998. Nitrogen cycling in the gut. *Annual Review of Nutrition* 18, 385-411.
- Gandemer G 2002. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science* 62, 309-321.
- García-Valverde R, Barea R, Lara L, Nieto R, Aguilera JF 2008. The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science* 114, 263-273.
- García-Valverde R, Nieto R., Aguilera JF 2010. Effects of herbage ingestion upon ileal digestibility of amino acids in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 203-214.
- García-Villalobos H, Morales-Trejo A, Araiza-Piña BA, Htoo JK, Cervantes-Ramírez M 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition* 66, 257-270.
- Gatti R, De Palo CB, Spinella P, De Palo EF 1998. Free carnitine and acetyl carnitine plasma levels and their relationship with body muscular mass in athletes. *Amino acids* 14, 361-369
- Gerbens F 2004. Cap. 16 Genetic Control of Intramuscular Fat Accretion, In: te Pas, M.F., Everts, M.E., Haagsman, H.P. (Eds.), *Muscle development of livestock animals: Physiology, genetics and meat quality*, CABI, p. 343
- Gerfault V, Louveau I, Mourot J, Le Dividich J 2000. Lipogenic enzyme activities in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle from neonatal pigs consuming maternal or formula milk. *Reproduction Nutrition Development* 40, 103-112.
- Gietzen DW, Hao S, Anthony TG 2007. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annual Review of Nutrition* 27, 63-78.
- Gloaguen M, Le Floc'h N, van Milgen J 2013. Couverture des besoins en acides aminés chez le porcelet alimenté avec des régimes à base teneur en protéines. *INRA Production animal* 26, 277-288.

- Gondret F, Guitton N, Guillerm-Regost C, Louveau I 2008. Regional differences in porcine adipocytes isolated from skeletal muscle and adipose tissues as identified by a proteomic approach. *Journal of Animal Science* 86, 2115-2125.
- Gondret F, Leuret B 2002. Feeding intensity and dietary protein level affect adipocyte cellularity and lipogenic capacity of muscle homogenates in growing pigs, without modification of the expression of sterol regulatory element binding protein. *Journal of Animal Science* 80, 3184-3193.
- Gondret F, Lefaucheur L, Juin H, Louveau I, Leuret B 2006. Low birth weight is associated with enlarged muscle fiber area and impaired meat tenderness of the longissimus muscle in pigs. *Journal of Animal Science* 84, 93-103
- Gondret F, Lefaucheur L, Louveau I, Leuret B, Pichodo X, Le Cozler Y 2005. Influence of piglet birth weight on postnatal growth performance, tissue lipogenic capacity and muscle histological traits at market weight. *Livestock Production Science* 93, 137-146.
- Gondret F, Mourot J, Bonneau M 1998. Comparison of intramuscular adipose tissue cellularity in muscles differing in their lipid content and fibre type composition during rabbit growth. *Livestock Production Science* 54, 1-10.
- González E, Hernández-Matamoros A, Tejeda JF 2012. Two by-products of the olive oil extraction industry as oleic acid supplement source for Iberian pigs: effect on the meat's chemical composition and induced lipoperoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2543-2551.
- Guo X, Tang R, Wang W, Liu D, Wang K 2011. Effects of dietary protein/carbohydrate ratio on fat deposition and gene expression of peroxisome proliferator activated receptor γ and heart fatty acid-binding protein of finishing pigs. *Livestock Science* 140, 111-116.
- Hamill RM, McBryan J, McGee C, Mullen AM, Sweeney T, Talbot A, Cairns MT, Davey GC 2012. Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat science* 92, 440-450.
- Harris CI, Milne G 1981. The inadequacy of urinary N τ -methyl histidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown. *British Journal of Nutrition* 45, 423-429.
- Hauser N, Mourot J, De Clercq L, Genart C, Remacle C 1997. The cellularity of developing adipose tissues in Pietrain and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development* 37, 617-625.
- Heo K, Odle J, Han IK, Cho W, Seo S, van Heugten E, Pilkington DH 2000. Dietary L-carnitine improves nitrogen utilization in growing pigs fed low energy, fat-containing diets. *Journal of Nutrition* 130, 1809-1814.
- Hernández-Matamoros A 2014. Aportaciones al estudio de la caracterización de los sistemas de alimentación del cerdo ibérico. Tesis Doctoral.

- Heyer A, Lebret B 2007. Compensatory growth response in pigs: effects on growth performance, composition of weight gain at carcass and muscle levels, and meat quality. *Journal of Animal Science* 85, 769-78.
- Hocquette JF, Gondret F, Baéza E, Médale F, Jurie C, Pethick DW 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* 4, 303-319.
- Hsieh SL, Kuo CM 2005. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 95-101.
- Hsu RY, Lardy HA 1969. *Enzima málica, métodos en enzimología*, New York, USA, Academic Press, p 230-235.
- Hulshof TG, van der Poel AFB, Hendriks WH, Bikker P 2017. Amino acid utilization and body composition of growing pigs fed processed soybean meal or rapeseed meal with or without amino acid supplementation. *Animal* 11, 1125-1135
- Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 571-588.
- 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. *Journal of Animal Science* 71, 930-938.
- Katsumata M 2011. Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. *Animal Science Journal* 82, 17-25
- Katsumata M, Kawakami S, Kaji Y, Takada R, Dauncey MJ 2002. Differential regulation of porcine hepatic IGF-I mRNA expression and plasma IGF-I concentration by a low lysine diet. *The Journal of Nutrition* 132, 688-692.
- Katsumata M, Kobayashi SI, Matsumoto M, Tsuneishi E, Kaji Y 2005. Reduced intake of dietary lysine promotes accumulation of intramuscular fat in the Longissimus dorsi muscles of finishing gilts. *Animal Science Journal* 76, 237-244.
- Katsumata M, Matsumoto M, Kobayashi SI, Kaji Y 2008. Reduced dietary lysine enhances proportion of oxidative fibers in porcine skeletal muscle. *Animal Science Journal* 79, 347-353.
- Kelley DS 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 17, 669-673.
- Kelly FJ, Goldspink DF 1982. The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochemical Journal* 208, 147-151.

- Kendall DC, Gaines AM, Allee GL, Usry JL 2008. Commercial validation of the true ileal digestible lysine requirement for eleven-to twenty-seven-kilogram pigs. *Journal of Animal Science* 86, 324-332.
- Kloareg M, Noblet J, van Milgen J 2007. Deposition of dietary fatty acids, de novo synthesis and anatomical partitioning of fatty acids in finishing pigs. *British Journal of nutrition* 97, 35-44.
- Kobayashi H, Ishida A, Ashihara A, Nakashima K, Katsumata M 2012. Effects of dietary low level of threonine and lysine on the accumulation of intramuscular fat in porcine muscle. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76, 2347-2350.
- Kong XF, Yin YL, He QH, Yin FG, Liu HJ, Li TJ, Huang RL, Geng MM, Ruan Z, Deng ZY, Xie MY, Wu G 2009. Dietary supplementation with Chinese herbal powder enhances ileal digestibilities and serum concentrations of amino acids in young pigs. *Amino acids* 37, 573-582.
- Kouba M, Enser M, Whittington FM, Nute GR, Wood JD 2003. Effect of a high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition and meat quality in the growing pig. *Journal of Animal Science* 81, 1967-1979.
- Kouba M, Mouro J 2011. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 93, 13-17.
- Kramer JK, Zhou J 2001. Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 594-600.
- Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, Porter JW 1972. Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3': 5' cyclic monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69, 3516-3519.
- Lambe NR, Wood JD, McLean KA, Walling GA, Whitney H, Jagger S, Fullarton P, Bayntun J, Bünger L 2013. Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype 2. Compositional traits measured with computed tomography (CT). *Meat Science* 95, 129-136.
- Latorre MA, García-Belenguer E, Ariño L 2008. The effects of sex and slaughter weight on growth performance and carcass traits of pigs intended for dry-cured ham from Teruel (Spain). *Journal of Animal Science* 86, 1933-1942.
- Latorre MA, Ripoll G, García-Belenguer E, Ariño L 2009. The increase of slaughter weight in gilts as a strategy to optimize the production of Spanish high quality dry-cured ham. *Journal of Animal Science* 87, 1464-1471.
- Lawrie RA 1998. The eating quality of meat. In "Meat Science" 6th edn. pp. 212-257. (Woodhead Publishing: Cambridge)
- Lebret B 2008. Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal* 2, 1548-1558.

- Lebret B, Guillard AS 2005. Outdoor rearing of cull sows: Effects on carcass, tissue composition and meat quality. *Meat Science* 70, 247-257.
- Lebret B, Prunier A, Bonhomme N, Foury A, Mormède P, Dourmad JY 2011. Physiological traits and meat quality of pigs as affected by genotype and housing system. *Meat Science* 88, 14-22.
- Lefaucheur L 2010. A second look into fibre typing—Relation to meat quality. *Meat Science* 84, 257-270.
- Lefaucheur L, Milan D, Ecolan P, Le Callennec C 2004. Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs. *Journal of Animal Science* 82, 1931-1941.
- Leibholz J, Love RJ, Mollah Y, Carter RR 1986. The absorption of dietary L-lysine and extruded L-lysine in pigs. *Animal Feed Science and Technology* 15, 141-148.
- Lents CA, Brown-Brandl TM, Rohrer GA, Oliver WT, Freking BA 2016. Plasma concentrations of acyl-ghrelin are associated with average daily gain and feeding behavior in grow-finish pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 55, 107-113.
- Leseigneur-Meynier A, Gandemer G 1991. Lipid composition of pork muscle in relation to the metabolic type of the fibres. *Meat Science* 29, 229-241.
- Li X, Bazer FW, Gao H, Jobgen W, Johnson GA, Li P, McKnight JR, Satterfield MC, Spencer TE, Wu G 2009. Amino acids and gaseous signaling. *Amino Acids* 37, 65-78.
- Liao SF, Wang T, Regmi N 2015. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *SpringerPlus* 4, 147.
- Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*, Article ID 3182746, 14 pages.
- Liu Y, Li F, Kong X, Tan B, Li Y, Duan Y, Blachier F, Hu CA, Yin Y 2015. Signaling pathways related to protein synthesis and amino acid concentration in pig skeletal muscles depend on the dietary protein level, genotype and developmental stages. *PLoS one*, 10, e0138277.
- Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ 2006. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *The Journal of Nutrition* 136, 212-217.
- Lobley GE 1988. Protein turnover and energy metabolism in animals: interactions in leanness and obesity. In *Leanness in Domestic Birds. Genetic, Metabolic and Hormonal Aspects* (pp. 331-361). Butterworths Co INRA.
- Lobley GE 1994. Amino acid and protein metabolism in the whole body and individual tissues of ruminants. *Principles of Protein Nutrition of Ruminants* 147-178.
- Lopez-Bote CJ 1998. Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science* 49, 17-27.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193, 265-75.
- MacLennan PA, Brown RA, Rennie MJ 1987. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS letters* 215, 187-191.
- MacLennan PA, Smith K, Weryk B, Watt PW, Rennie MJ 1988. Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. *FEBS letters* 237, 133-136.
- Madeira MS, Costa P, Alfaia CM, Lopes PA, Bessa RJB, Lemos JPC, Prates JA 2013. The increased intramuscular fat promoted by dietary lysine restriction in lean but not in fatty pig genotypes improves pork sensory attributes. *Journal of Animal Science* 91, 3177-3187.
- Madeira MS, Pires VM, Alfaia CM, Costa AS, Luxton R, Doran O, Bessa RJB, Prates JA 2013. Differential effects of reduced protein diets on fatty acid composition and gene expression in muscle and subcutaneous adipose tissue of Alentejana purebred and Large Whitex Landrace× Pietrain crossbred pigs. *British Journal of Nutrition* 110, 216-229.
- Maes DGD, Janssens GPJ, Delputte P, Lammertyn A, de Kruif A 2004. Back fat measurements in sows from three commercial pig herds: relationship with reproductive efficiency and correlation with visual body condition scores. *Livestock Production Science* 91, 57-67.
- Mahan DC, Shields RG 1998. Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *Journal of Animal Science* 76, 513-521.
- Majumder M, Yaman I, Gaccioli F, Zeenko VV, Wang C, Caprara MG, Venema RC, Komar AA, Snider MD, Hatzoglou M 2009. The hnRNA-binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Molecular and Cellular Biology* 29, 2899-2912.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2017a. Zootecnia. Porcino. (In Spanish.) <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/porcino/iberico/default.aspx>. Accedido en Mayo de 2017
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2017b. Producción y mercados ganaderos. Porcino. (In Spanish.) <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>. Accedido en Mayo de 2017
- Martínez-Aispuro M, Figueroa-Velasco JL, Zamora-Zamora V, Sánchez-Torres MT, Ortega-Cerrilla ME, Cordero-Mora JL, Ruiz-Flores A, González-Muñoz SS 2012. Effect of fatty acids source on growth performance, carcass characteristics, plasma urea nitrogen concentration, and

- fatty acid profile in meat of pigs fed standard- or low-protein diets. *Spanish Journal of Agriculture Research* 10, 993-1004
- Martinez-Puig D, Mourot J, Ferchaud-Roucher V, Anguita M, Garcia F, Krempf M, Pérez JF 2006. Consumption of resistant starch decreases lipogenesis in adipose tissues but not in muscular tissues of growing pigs. *Livestock Science* 99, 237-247.
- Maw SJ, Fowler VR, Hamilton M, Petchey AM 2003. Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. *Meat Science* 63, 185-190.
- Mayes PA 1996. Oxidation of fatty acids: ketogenesis. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds), *Harper's Biochemistry*, 24th ed, pp. 224–235. Appleton & Lange, Stamford.
- Meijer AJ 2003. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *The Journal of Nutrition* 133, 2057S-2062S.
- Meijer AJ, Dubbelhuis PF 2004. Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 397-403.
- Mienaltowski MJ, Birk DE 2014. Cap 3: Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. In *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases* (pp. 31-47). Springer Netherlands. Edi.: Halper, J., Kjaer, M.
- Miyazaki M, Esser KA 2009. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *Journal of Applied Physiology* 4, 1367-1373.
- Moeller SJ, Miller RK, Edwards KK, Zerby HN, Logan KE, Aldredge TL, Stahl CA, Boggess M, Box-Steffensmeier JM 2010. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. *Meat Science* 84, 14–22.
- Moore S 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *The Journal Biological Chemistry* 238, 235-237
- Morales A, García H, Arce N, Cota M, Zijlstra RT, Araiza BA, Cervantes M 2015. Effect of L-lysine on expression of selected genes, serum concentration of amino acids, muscle growth and performance of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99, 701-709.
- Morales J, Pérez 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. *Livestock Production Science* 77, 195-205.
- Morcuende D, Estévez M, Ramírez R, Cava R 2007. Effect of the Iberian× Duroc reciprocal cross on productive parameters, meat quality and lipogenic enzyme activities. *Meat Science* 76, 86-94.

- Moughan PJ 2005. Absorption of chemically unmodified lysine from proteins in foods that have sustained damage during processing or storage. *Journal of AOAC International* 88, 949-954.
- Mourot J, Kouba M 1999. Development of intra-and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development* 39, 125-132.
- Mourot J, Kouba M, Bonneau M 1996. Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing Meishan pig: Comparison with the Large White pig (*Sus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 115, 383-388.
- Mourot J, Kouba M, Peiniau P 1995. Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing domestic pig (*Sus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 111, 379-384.
- Mourot J, Kouba M. 1998. Lipogenic enzyme activities in muscles of growing Large White and Meishan pigs. *Livestock Production Science* 55, 127-133.
- Mullan BP, Williams IH 1990. The chemical composition of sows during their first lactation. *Animal Science* 51, 375-387.
- Muriel E, Ruiz J, Ventanas J, Antequera T 2002. Free-range rearing increases (n-3) polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chemistry* 78, 219-225.
- Muriel ME, Ruiz J, Ventanas J, Petróñ MJ, Antequera T 2004. Meat quality characteristics in different lines of Iberian pigs. *Meat Science* 67, 299-307.
- Naatjes M, Htoo JK, Walter K, Tölle KH, Susenbeth A 2014. Effect of dietary tryptophan to lysine ratio on growth of young pigs fed wheat–barley or corn based diets. *Livestock Science* 163, 102-109.
- Nawar WW 1996. Lipids. In "Food Chemistry". (Ed. OR Fennema) pp. 225–319. (Marcel Dekker: New York)
- Needham T, Hoffman LC 2015. Physical meat quality and chemical composition of the Longissimus thoracis of entire and immunocastrated pigs fed varying dietary protein levels with and without ractopamine hydrochloride. *Meat Science* 110, 101-108.
- Neuromuscular 2017. <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/histol/nadh.htm>. Accedido en Octubre de 2017
- Newsholme P, Brennan L, Blanca RUBI, Maechler P 2005. New insights into amino acid metabolism, β -cell function and diabetes. *Clinical Science* 108, 185-194.
- Newton AE, Fairbanks AJ, Golding M, Andrewes P, Gerrard JA 2012. The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products—not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. *Food and Function* 3, 1231-1241.

- Nieto R, Barea R, Lara L, Palma-Granados P, Aguilera JF 2015a. Lysine requirement relative to total dietary protein for optimum performance and carcass protein deposition of Iberian piglets. *Animal Feed Science and Technology* 206, 48-56.
- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Aguinaga MA, Conde-Aguilera JA, Aguilera JF 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science* 90, 3809-3820.
- Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Conde-Aguilera JA, Aguilera JF 2013. Growth of body components and carcass composition of Iberian pigs of 10 to 150 kg body weight as affected by the level of feeding and dietary protein concentration. *Journal of Animal Science* 91, 4197-4207.
- Nieto R, Lara L, García MA, Gómez F, Zalvide M, Cruz M, Pariente JM, Moreno A, Aguilera JM 2001. Evaluación de un sistema integrado de alimentación en el cerdo ibérico, análisis del consumo de alimento e índices productivos. *Sólo Cerdo Ibérico* 6, 57-69.
- Nieto R, Martínez-Pérez M, Haro A, Lara L, Aguilera JF 2015. Effects of protein intake on rate of growth, protein deposition, and carcass traits of heavy Iberian pigs. *Journal of Animal Science* 93, 3471-3482.
- Nieto R, Miranda A, García MA, Aguilera JF 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs, from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition* 88, 39-49.
- NRC, National Research Council 1998. *Nutrient Requirements of Swine*, 10th revised edition. National Academic Press, Washington, DC, USA.
- NRC, National Research Council 2012. *Nutrient Requirements of Swine*, 11th revised edition. National Academic Press, Washington, DC, USA.
- NSNG, National Swine Nutrition Guide. 2010. US Pork Center of Excellence. Iowa State University. Ames, IA. EEUU
- Ntawubizi M, Raes K, Buys N, De Smet S 2009. Effect of sire and sex on the intramuscular fatty acid profile and indices for enzyme activities in pigs. *Livestock Science* 122, 264-270.
- O'Hea EK, 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. *Journal of Nutrition* 99, 338-344.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2015. Nota descriptiva N° 394. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/es/>
- Orengo J, Villodre C, Madrid J, Martínez S, López MJ, Megías MD, Valera L, Hernández F 2014. Effect of dietary crude glycerin on growth performance, nutrient digestibility and hormone levels of Iberian crossbred pigs from 50 to 100 kg body weight. *Livestock Science* 165, 95-99.

- Óvilo C, Fernández A, Fernández AI, Folch JM, Varona L, Benítez R, Nuñez Y, Rodríguez C, Silió L 2010. Hypothalamic expression of porcine leptin receptor (LEPR), neuropeptide Y (NPY), and cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) genes is influenced by LEPR genotype. *Mammalian Genome* 21, 583-591.
- Owen KQ, Nelssen JL, Goodband RD, Tokach MD, Friesen KG 2001. Effect of dietary L-carnitine on growth performance and body composition in nursery and growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science* 79, 1509-1515.
- Ozawa S, Mitsuhashi T, Mitsumoto M, Matsumoto S, Itoh N, Itagaki K, Kohno Y, Dohgo T 2000. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science* 54, 65-70.
- Palma-Granados P, Seiquer I, Nieto R 2017. Actividad de enzimas lipogénicas en grasa dorsal y longissimus dorsi de lechones ibéricos y Landrace x Large White. (*Lipogenic enzyme activity in backfat adipose tissue and longissimus dorsi muscle of Iberian and Landrace x Large-White piglets*). XVII Jornadas sobre Producción Animal, AIDA, 30-31 May 2017, Zaragoza, Spain, pp. 249-251.
- Papes F, Surpili MJ, Langone F, Trigo JR, Arruda P 2001. The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS letters* 488, 34-38.
- Pereira PM, Vicente AF 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* 93, 586-592.
- Peter ER, Smith WJ 1997. Anatomía y fisiología del porcino. En: La Cerda. Alostair MacLean. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico. D.F. Pág 17- 20.
- Pettigrew JE, Esnaola MA 2001. Swine nutrition and pork quality: A review. *Journal of Animal Science* 79, 316-342.
- Poulsen L, Siersbaek M, Mandrup S 2012. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 631-639.
- Pugliese C, Sirtori F 2012. Quality of meat and meat products produced from southern European pig breeds. *Meat Science* 90, 511-518.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Ramírez R, Cava R 2007. Carcass composition and meat quality of three different Iberianx Duroc genotype pigs. *Meat Science* 75, 388-396.
- Reggiani C, Mascarello F 2004. Fibre type identification and functional characterization in adult livestock animals. In *Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality*. Ed. MF te Pas, ME Everts and HP Haagsman, pp 39-68. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Rehfeldt C, Fiedler I, Stickland NC 2004. Number and size of muscle fibres in relation to meat production. In *Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality*. Ed. MF te Pas, ME Everts and HP Haagsman, pp 1-38. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Reig M, Aristoy MC, Toldrá F 2013. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry* 140, 478-482.
- Ren JB, Zhao GY, Li YX, Meng QX 2007. Influence of dietary lysine level on whole-body protein turnover, plasma IGF-I, GH and insulin concentration in growing pigs. *Livestock Science* 110, 126-132.
- RIBER, Registro General Informativo de Organismos Independientes de Control del Ibérico 2016. En MAPAMA, 2017b. Producción y mercados ganaderos. Porcino. (In Spanish.) <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>. Accedido en Mayo de 2017
- Riedijk MA, Stoll B, Chacko S, Schierbeek H, Sunehag AL, van Goudoever JB, Burrin DG 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3408-3413.
- Rivera-Ferre MG, Aguilera JF, Nieto R 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Nutrition* 135, 469-478.
- Rivera-Ferre MG, Aguilera JF, Nieto R 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science* 84, 3346-3355.
- Rodríguez-Sánchez JA, Sanz MA, Blanco M, Serrano MP, Joy M, Latorre MA 2011. The influence of dietary lysine restriction during the finishing period on growth performance and carcass, meat, and fat characteristics of barrows and gilts intended for dry-cured ham production. *Journal of Animal Science* 89, 3651-3662
- Rostagno JS 2011. *Tablas Brasileñas para Aves y Porcino*. 3ª ed. Universidad Federal Vicosa, Brasil.
- Roy N, Lapierre H, Bernier JF 2000. Whole-body protein metabolism and plasma profiles of amino acids and hormones in growing barrows fed diets adequate or deficient in lysine. *Canadian Journal of Animal Science* 80, 585-595.
- Ruiz-Ascacibar I, Stoll P, Kreuzer M, Boillat V, Spring P, Bee G 2017. Impact of amino acid and CP restriction from 20 to 140 kg BW on performance and dynamics in empty body protein and lipid deposition of entire male, castrated and female pigs. *Animal* 11, 394-404.
- Sauvant D, Perez JM, Tran G 2004. *Tables of composition and nutritional value of feed materials. Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish*. INRA Editions and AFZ, Paris, France.

- Schwarz EL, Roberts WL, Pasquali M 2005. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* 354, 83-90.
- Scollan ND, Hocquette JF, Nuernberg K, Dannenberger D, Richardson RI, Maloney A 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science* 74, 17–33.
- Serra X, Gil F, Pérez-Enciso M, Oliver MA, Vázquez JM, Gispert M, Diaz I, Moreno F, Latorre R, Noguera JL 1998. A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science* 56, 215-223.
- Sheehan DC, Hrapchak BB 1987. *Theory and practice of histotechnology*. 2nd Edition, Battelle Memorial Institute.
- Shelton NW, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, Nelssen JL, DeRouche JM 2011. Effects of increasing dietary standardized ileal digestible lysine for gilts grown in a commercial finishing environment. *Journal of Animal Science* 89, 3587-3595.
- Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G 2004. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* 41, 415-433.
- Shikata N, Maki Y, Noguchi Y, Mori M, Hanai T, Takahashi M, Okamoto M 2007. Multi-layered network structure of amino acid (AA) metabolism characterized by each essential AA-deficient condition. *Amino Acids* 33, 113-121.
- Shingfield KJ, Ahvenjarvi S, Toivonen V, Arola A, Nurmela KVV, Huhtanen P, Griinari JM 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science* 77, 165–179.
- Simopoulos AP 2011. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology* 44, 203-215.
- Soares JB, Leite-Moreira AF 2008. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29, 1255-1270.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJM 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146-152.
- Steiber A, Kerner J, Hoppel CL 2004. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 455-473.
- Stein HH, Seve B, Fuller MF, Moughan PJ, De Lange CFM 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science* 85, 172-180.
- Steinbacher P, Eckl P 2015. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5, 356-377.

- Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *The Journal of Nutrition* 128, 606-614.
- Straadt IK, Aaslyng MD, Bertram HC 2013. Sensory and consumer evaluation of pork loins from crossbreeds between Danish Landrace, Yorkshire, Duroc, Iberian and Mangalitza. *Meat Science* 95, 27–35.
- Suarez-Belloch J, Sanz MA, Joy M, Latorre MA 2013. Impact of increasing dietary energy level during the finishing period on growth performance, pork quality and fatty acid profile in heavy pigs. *Meat Science* 93, 796-801.
- Suenaga R, Tomonaga S, Yamane H, Kurauchi I, Tsuneyoshi Y, Sato H, Denbow DM, Furuse M 2008. Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. *Amino Acids* 35, 139-146.
- Suzuki K, Shibata T, Kadowaki H, Abe H, Toyoshima T 2003. Meat quality comparison of Berkshire, duroc and crossbred pigs sired by Berkshire and duroc. *Meat Science* 64, 35-42.
- Swaid F, Sukhotnik I, Matter I, Berkowitz D, Hadjittofi C, Pollak Y, Lavy A 2013. Dietary glutamine supplementation prevents mucosal injury and modulates intestinal epithelial restitution following acetic acid induced intestinal injury in rats. *Nutrition and Metabolism* 10, 53.
- Takenaka A, Oki N, Takahashi SI, Noguchi T 2000. Dietary restriction of single essential amino acids reduces plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) but does not affect plasma IGF-binding protein-1 in rats. *The Journal of Nutrition* 130, 2910-2914.
- Tejerina D, García-Torres S, de Vaca MC, Vázquez FM, Cava R 2012. Effect of production system on physical–chemical, antioxidant and fatty acids composition of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from Iberian pig. *Food Chemistry* 133, 293-299.
- Teye GA, Sheard PR, Whittington FM, Nute GR, Stewart A, Wood JD 2006. Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Science* 73, 157–165.
- Tomas FM, Campbell RG, King RH, Johnson RJ, Chandler CS, Taverner MR 1992. Growth hormone increases whole-body protein turnover in growing pigs. *Journal of Animal Science* 70, 3138-3143.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156.
- Torras-Llort M, Torrents D, Soriano-Garcia JF, Gelpi JL, Estevez R, Ferrer R, Palacín M, Moreto M 2001. Sequential amino acid exchange across b_{0,+}-like system in chicken brush border jejunum. *Journal of Membrane Biology* 180, 213-220.

- Tous N, Lizardo R, Vila B, Gispert M, Font-i-Furnols M and Esteve-Garcia E 2014. Effect of reducing dietary protein and lysine on growth performance, carcass characteristics, intramuscular fat, and fatty acid profile of finishing barrows. . *Journal of Animal Science* 92, 129-140.
- Tybirk P, Sloth NM, Joergensen L 2013. Nutrient Requirement Standards. 18th ed. Pig Research Centre. http://www.pigresearchcentre.dk/~media/pdf/eng/Normer_naeringstoffer%20UK/Nutrient_standards_April2013.ashx.
- van Goudoever JB, Stoll B, Henry JF, Burrin DG, Reeds PJ 2000. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 11620-11625.
- van Laack RLJM, Stevens SG, Stalder KJ 2001. The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of Animal Science* 79, 392-397.
- van Lunen TA, Cole DJA 1996. Energy-amino acid interactions in modern pig genotypes. In: P.C. Garnsworthy, J. Wiseman and W. Haresign, editors, *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. pp. 233-261.
- van Milgen J 2002. Modeling biochemical aspects of energy metabolism in mammals. *The Journal of Nutrition* 132, 3195-3202.
- van Milgen J, Dourmad JY 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *Journal of animal Science and Biotechnology* 6, 15.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, research0034
- Vaz FM, Wanders RJ 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal* 361, 417-429.
- Vázquez-Gómez M, García-Contreras C, Torres-Rovira L, González-Bulnes A, Redondo BI 2016. Factores prenatales y postnatales que influyen en el tipo de fibra muscular y la calidad de carne en el cerdo Ibérico. *Solo Cerdo Ibérico* 36, 60-68.
- Ventanas S, Ventanas J, Jurado Á, Estévez M 2006. Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian× Duroc crossbred pigs. *Meat Science* 73, 651-659.
- Ventanas S, Ventanas J, Ruiz J, Estévez M, Pandalai SG 2005. Iberian pigs for the development of high-quality cured products. *Recent research in development in agricultural and food chemistry* 6, 27-53.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW 2007. Cap. 19 Metabolismo de lípidos. *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. 2ª Ed Médica Panamericana.
- Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F, Li D, Yin Y, Wu G 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *The Journal of Nutrition* 138, 1025-1032.

- Wang S, Zhou G, Shu G, Wang L, Zhu X, Gao P, Xi Q, Zhang Y, Yuan L, Jiang Q 2013. Glucose utilization, lipid metabolism and BMP-Smad signaling pathway of porcine intramuscular preadipocytes compared with subcutaneous preadipocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 31, 981-996.
- Waterlow JC 1999. The mysteries of nitrogen balance. *Nutrition Research Reviews* 12, 25-54.
- Webb EC, O'Neill HA 2008. The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science* 80, 28-36.
- White BR, Lan YH, McKeith FK, Novakofski J, Wheeler MB, McLaren DG 1995. Growth and body composition of Meishan and Yorkshire barrows and gilts. *Journal of Animal Science* 73, 738-749.
- White P, Cattaneo D, Dauncey MJ 2000. Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *British Journal of Nutrition* 84, 185-194.
- Whittemore CT, Hazzledine MJ, Close WH 2003. Nutrient requirement standards for pigs. British Society of Animal Science, Penicuik, UK.
- Wigmore PM, Stickland NC 1983. Muscle development in large and small pig fetuses. *Journal of Anatomy* 137, 235-245.
- Wimmers K, Ngu NT, Jennen DGJ, Tesfaye D, Murani E, Schellander K, Ponsuksili S 2008. Relationship between myosin heavy chain isoform expression and muscling in several diverse pig breeds. *Journal of Animal Science* 86, 795-803.
- Wiseman TG, Mahan DC 2010. Partition of minerals in body components from a high- and low-lean genetic line of barrows and gilts from 20 to 125 kilograms of body weight. *Journal of Animal Science* 88, 3337-3350.
- Witte DP, Ellis M, McKeith FK, Wilson ER 2000. Effect of dietary lysine level and environmental temperature during the finishing phase on the intramuscular fat content of pork. *Journal of Animal Science* 78, 1272-1276.
- Wolfe RR 1992. Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetic analysis.
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78, 343-358.
- Wood JD, Nute GR, Richardson RI, Whittington FM, Southwood O, Plastow G, Mansbridge R, da Costa N, Chang KC 2004. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science* 67, 651-667.
- Wu G 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1-17.

- Wu G 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 1, 31-37.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Meininger CJ, Spencer TE, Yin YL 2007. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livestock Science* 112, 8-22.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition* 134, 489-492.
- Wu G, Meier SA, Knabe DA 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *The Journal of nutrition* 126, 2578.
- Wu G, Morris SM 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* 336, 1-17
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Yang N, Liu X, Ding EL, Xu M, Wu S, Liu L, Sun X, Hu FB 2009. Impaired ghrelin response after high-fat meals is associated with decreased satiety in obese and lean Chinese young adults. *The Journal of Nutrition* 139, 1286-1291.
- Yao K, Yin YL, Chu W, Liu Z, Deng D, Li T, Huang R, Zhang J, Tan B 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *The Journal of Nutrition* 138, 867-872.
- Yen JT, Kerr BJ, Easter RA, Parkhurst AM 2004. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *Journal of Animal Science* 82, 1079-1090.
- Yu AN, Tan ZW, Wang FS 2012. Mechanism of formation of sulphur aroma compounds from L-ascorbic acid and L-cysteine during the Maillard reaction. *Food Chemistry* 132, 1316-1323.
- Zhou G, Wang S, Wang Z, Zhu X, Shu G, Liao W, Yu K, Gao P, Xi Q, Wang X 2010. Global comparison of gene expression profiles between intramuscular and subcutaneous adipocytes of neonatal landrace pig using microarray. *Meat Science* 86, 440-450.