

Modificación en la composición de ácidos grasos del huevo al incluir aceite de sardina y ácido linoleico conjugado en dietas para gallinas ponedoras[#]

Modulation in egg fatty acids composition when laying hens diets are supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid

S Carrillo^{a,b*}, E Ávila^a, C Vásquez^a, C Calvo^b, ME Carranco^b, F Pérez-Gil^b

^aFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

^bDepartamento de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México.

SUMMARY

The regular intake of omega 3 fatty acids (C18:3 ALA, C20:5 EPA, C22:6 DHA) and conjugated linoleic acid (C18:2 CLA) is currently recommended due to their importance in the prevention and control of cardiovascular diseases, diabetes and several types of cancer. The aim of this study was to determine the effect of supplementing laying hens diets with sardine oil and CLA on egg fatty acid composition. 240 Bovans White hens were randomly distributed into four treatments with 5 replicates of 12 hens each one. The treatments consisted in a control diet (T1), T1 plus 2.5% of sardine oil (T2), and T2 padded with 1% and 2% of CLA (T3 and T4 respectively). The experimental trial was carried out during four weeks. At the end of that period, 50 eggs from each treatment were taken to determine fatty acids through gas chromatography. As opposed to the control treatment, the results showed an increase in omega 3 fatty acid (6.0% vs 1.6% total fatty acids) and CLA (3-5% vs 0.7% total fatty acids) concentration in eggs, and n6:n3 ratio of 1.3:1 vs 11:1, observed in T2, T3 and T4 ($P < 0.05$). It is concluded that supplementation of laying hen diets with sardine oil and CLA makes it possible to produce eggs with a double added value.

Palabras clave: ácido linoleico conjugado, aceite de sardina, huevo, ácidos grasos omega tres.

Key words: conjugated linoleic acid, sardine oil, eggs, omega 3 fatty acids.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y diferentes tipos de cánceres se han convertido en las principales causas de mortalidad en muchos países de occidente. Sin embargo, se ha observado que consumir en forma regular los ácidos grasos omega 3 (AGn3), eicosapentaenoico (C20:5 n3 EPA) y docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA) puede no solo ser de gran utilidad en la prevención y control de estas enfermedades, sino también proporcionar otros beneficios a la salud (Holub 2002). De ahí el interés de muchos investigadores por buscar ingredientes útiles para enriquecer con AGn3 alimentos de fácil consumo y bajo costo, como el huevo de gallina. Los aceites de pescado han resultado ser uno de los ingredientes más aceptados para lograr tal fin, ya que tienen un alto contenido de EPA y DHA (Hargis y col 1991, Castillo-Badillo y col 2005, Cachaldora y col 2006). Diversos estudios han demostrado la efectividad en el uso de estos aceites marinos en la ración, ya que sus AGn3 son depositados en la yema, existiendo la recomendación de no usar niveles

superiores al 3% de la ración a fin de no afectar negativamente el sabor del huevo ni las variables productivas de las aves (Hargis y col 1991, González-Esquerria y Leeson 2000, 2001, Cherian 2008, Kralik y col 2008).

Por otra parte, en los últimos años el uso del ácido linoleico conjugado (CLA) en la dieta para las aves ha cobrado mucho interés en virtud de los múltiples beneficios a la salud que este también ofrece. Sus isómeros más abundantes son el 18:2 $\Delta cis 9$, *trans* 11 y el 18:2 $\Delta trans 10$, *cis* 12. Se sabe que el CLA tiene efecto hipocolesterolémico, hipotriglicéridémico y antiaterogénico. En el sistema inmune ejerce una estimulación en la síntesis de IgA, IgG, IgM y una disminución significativa en los niveles de IgE, por lo que se le considera como potencialmente efectivo en la prevención y tratamiento de alergias alimentarias. Su acción sobre el cáncer mamario parece ser el más significativo, aunque también su participación en la reducción del peso corporal ha cobrado gran interés en los últimos años (Pariza y Ha 1990, Ip 1997, Sanhueza y col 2002). Ante esta información el interés por incrementar el aporte de CLA en el huevo ha ido en aumento. Suksombat y col (2006) realizaron un ensayo en el que suministraron 0, 1, 2, 3 y 4% de CLA en la dieta de gallinas ponedoras y observaron que con 4% el consumo de alimento, el peso del huevo, del albumen y de la yema se redujeron significativamente ($P < 0,05$); lo mismo que el color de la yema, la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y la de los poliinsaturados (AGPI). Algunos autores sugieren

Acceptado: 10.07.2012.

[#] Financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

* Vasco de Quiroga N° 15, 14000 México D.F.; silvicarrillo3@hotmail.com

que suministrar en forma combinada CLA con aceite de pescado u otro tipo de grasa puede corregir estos efectos (Du y col 2000, Cherian y col 2002, Álvarez y col 2004, Kim y col 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto que sobre la composición en ácidos grasos del huevo y variables productivas del ave tiene suplementar la dieta de las gallinas con 2,5% de aceite de sardina (AS) más 1% y 2% de CLA.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL ACEITE DE PESCADO Y DEL CLA

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio provenía de Guaymas, Sonora, México, era no deodorizado y estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. La composición en ácidos grasos de este aceite se determinó por cromatografía de gases, siguiendo el método de la AOAC (2000) (método 969.33) (cuadro 1). El CLA utilizado fue Lutrell® Pure granulado

Cuadro 1. Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las dietas.

Fatty acids composition of oils used in the diets.

Ácido graso (%TAG)	Aceite de soya	Aceite de pescado
Mirístico (C14:0)	0,11	6,09
Palmítico (C16:0)	10,77	18,54
Palmitelaídico (C16:1)	0,00	0,13
Palmitoleico (C16:1)	0,18	7,47
Heptadecanoico (C17:0)	0,10	0,56
Cis-10-heptadecanoico (C17:1)	0,07	0,99
Esteárico (C18:0)	4,22	3,82
Oleico (C18:1 n9)	21,91	12,20
Cis-vaccénico (C18:1)	0,83	3,06
Linoleico (C18:2 n6)	53,23	13,70
Gamma linoléico (C18:3 n6)	0,06	0,31
Alfa linoléico (C18:3 n3)	6,95	0,99
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0,00	2,55
CLA t10, c12 (C18:2)	0,00	0,29
Araquídico (C20:0)	0,31	0,29
Eicosenoico (C20:1)	0,22	2,17
Cis-11,14-eicosenoico (C20:2)	0,05	0,25
Cis-11,14,17-eicosenoico (C20:3)	0,10	0,18
Araquidónico (C20:4 n6)	0,00	0,75
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0,40	14,20
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0,00	1,57
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0,00	10,26
Total	99,51	100,37

TAG: total de ácidos grasos; CLA: ácido linoleico conjugado.

(BASF), el cual contenía 20% de este compuesto conjugado (10% del isómero c9, t11 y 10% del isómero t10, c12).

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS DIETAS

La dieta base (DB) (cuadro 2) se formuló con el programa Nutrion Windows® (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas para esta línea genética (CPI 2008), con 15% de proteína cruda y 2.785 kcal de energía metabolizable. La DB (T1) fue elaborada con base en sorgo-soya conteniendo 4,5% de aceite de soya. Otras tres dietas (T2, T3 y T4) fueron suplementadas con 2,5% de aceite de sardina (AS), sustituyendo parcialmente al aceite de soya y dos de estas dietas tenían además 1% y 2% de CLA (concentración alcanzada al preparar las dietas con el producto comercial que contenía 20% de CLA). Los tratamientos quedaron de la siguiente manera: T1-dieta-base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA y T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA. Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos,

Cuadro 2. Composición de la dieta testigo (%).

Composition of control diet (%).

Ingrediente	%
Sorgo grano	62,67
Pasta de soya	20,71
Carbonato de calcio	9,85
Aceite de soya	4,50
Ortofosfato ¹	1,39
Sal yodada	0,40
Premezcla vitamínica ²	0,10
Avelut ³	0,10
DL-Metionina	0,07
Cloruro de colina 60	0,05
Premezcla mineral ⁴	0,05
Avired ⁵	0,05
Antioxidante	0,04
Antibiótico ⁶	0,02
Total	100,00

¹ Fosfato Monobásico. Fósforo 21% mínimo, Calcio 18% min, Flúor 0,21% max, Humedad 5% max.

² Vitaminas (por kg): A 10 000 000 UI, D₃ 3 000 000 UI, E 20 000 UI, K₃ 2.500 g, Tiamina 2.500 g, Riboflavina 5 g, Niacina 35 g, Ácido pantoténico 10 g, Piridoxina 4 g, Ácido fólico 1 g, Cianocobalamina 10 mg, Biotina 200 mg, excipiente cbp 1.000.

³ Fuente de xantofilas naturales amarillas (flor de cempazuchitl) 15 g/kg.

⁴ Minerales (mg/kg dieta): Manganeso 120, Zinc 100, Hierro 120, Cobre 12, Iodo 0,7, Selenio 0,4, Cobalto 0,2 excipiente cbp 1.000.

⁵ Pigmento vegetal rojo. Lucantin rojo (*Capsicum* sp). 5 g de carotenoides totales/kg.

⁶ Bacitracina.

y posteriormente en una de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos más a 75 rpm. El análisis de ácidos grasos de las dietas se realizó por cromatografía de gases (AOAC 2000 método 969.33) (cuadro 3).

ENSAYO EXPERIMENTAL

El ensayo tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac,

Distrito Federal. El clima de la región es templado sub-húmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes más frío y mayo el más caluroso. Se utilizaron 240 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, distribuidas al azar en cuatro tratamientos, con cinco réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de cuatro semanas, con una semana previa de acostumbamiento y un programa de 16 horas

Cuadro 3. Composición en ácidos grasos de las dietas (% del total de ácidos grasos).
Fatty acid composition of the diets (% of total fatty acid).

Ácidos grasos	T1	T2	T3	T4
Láurico (C12:0)	0,13	0,10	0,08	0,06
Mirístico (C14:0)	0,24	3,46	2,42	1,66
Pentadecanoico (C15:1)	0,04	0,31	0,22	0,16
cis10-pentadecenoico (C15:1)	0,07	0,05	0,00	0,06
Palmítico (C16:0)	13,03	17,01	14,58	13,48
Palmitelaídico (C16:1)	0,08	0,10	0,00	0,07
Palmitoleico (C16:1)	0,44	4,11	2,67	1,89
Heptadecanoico (C17:0)	0,12	0,35	0,28	0,25
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0,07	0,29	0,34	0,24
Esteárico (C18:0)	3,86	3,27	13,07	22,69
Oleico (C18:1 n9)	27,78	20,41	18,87	17,22
cis-vaccénico (C18:1)	0,72	2,23	1,61	1,20
Linoleico (C18:2 n6)	43,71	20,36	13,55	9,47
t9, t12, t15 (C18:2)	0,00	0,17	0,12	0,09
Gama-linolénico (C18:3 n6)	0,00	0,14	0,08	0,05
Alfa-linolénico (C18:3 n3)	4,54	1,60	1,05	0,69
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0,00	0,45	5,45	9,58
CLA t10,c12 (C18:2)	0,00	0,00	5,36	10,72
Araquídico (C20:0)	0,26	0,22	0,53	0,62
Eicosenoico (C20:1)	0,28	1,32	0,92	0,65
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0,04	0,11	0,08	0,05
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0,04	0,06	0,00	0,04
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0,04	0,23	0,00	0,12
Araquidónico (C20:4 n6)	0,19	0,45	0,25	0,18
Heneicosanoico (C21:0)	0,00	0,08	0,00	0,00
Behénico (C22:0)	0,17	0,07	0,00	0,00
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0,30	8,05	5,45	3,77
Erúcico (C22:1)	0,11	0,16	0,63	0,39
Docosapentaenoico (C22:5 n6)	0,00	0,16	0,11	0,07
Lignocérico (C24:0)	0,12	0,08	0,12	0,12
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0,00	1,08	0,70	0,46
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0,07	6,11	3,89	2,57
Ácidos grasos saturados	17,93	24,64	31,08	38,88
Ácidos grasos monoinsaturados	29,59	28,97	25,26	21,87
Ácidos grasos poliinsaturados	48,93	38,97	36,09	37,86
Total CLA	0,00	0,45	10,81	20,30
Total AGn6	43,90	21,12	13,99	9,77
Total AGn3	4,91	16,83	11,10	7,49
n6:n3	9:1	1.3:1	1.3:1	1.3:1

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+1%CLA, T4-DB+2.5%AS+2%CLA.
CLA- ácido linoleico conjugado.

de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Durante todo el período se llevó un registro del consumo de alimento, producción de huevo, peso del huevo, masa de huevo y conversión alimenticia. El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el cuidado de los animales, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

En la semana 4 se tomaron al azar 50 huevos por tratamiento (10 por réplica). Las yemas de cada réplica se mezclaron manualmente con una batidora para formar un "pool" (5 "pools" por tratamiento). El análisis de cada pool se hizo por duplicado. La extracción de lípidos en el huevo se realizó con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0,25 mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230 °C, inyector 150 °C, detector 300 °C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas y para el CLA el metil éster del ácido linoleico conjugado (Supelco® 37 FAME Mix SIGMA). La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en por ciento del total de ácidos grasos (%TAG).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, utilizando el PROC GLM de SAS versión 6.12 para Windows (SAS System, USA) y contrastes ortogonales ($P < 0,05$) para la comparación de medias de las relaciones T1 (dieta testigo) vs T2, T3, T4 (tratamientos que incluían aceite de sardina); T2 (tratamiento que tenía AS pero no CLA) vs T3, T4 (tratamientos que incluían AS y CLA); y T3 (tratamiento con AS más 1%CLA) vs T4 (tratamiento con AS más 2% CLA).

RESULTADOS

ACEITES

En el aceite de soya utilizado en este estudio se detectaron AG a partir del mirístico (C14:0). Los ácidos grasos (AG) que predominaron en este aceite fueron el linoleico (C18:2 n6), oleico (C18:1 n9), palmítico (C16:0) y el alfa-linolénico (C18:3 n3) (53%, 22%, 11% y 7%, respectivamente). En el aceite de sardina (AS) se detectaron AG a partir del láurico (C12:0), siendo los más abundantes el

palmítico, EPA, LA, oleico y el DHA (19%, 14%, 14%, 12% y 10%, respectivamente). La relación n6:n3 en el aceite de soya fue de 7:1, mientras que en el aceite de sardina fue 0.54:1 (cuadro 1).

DIETAS

En la dieta T1 predominaron los ácidos grasos LA (C18:2), oleico (C18:1), palmítico (C16:0) y ALA (C18:3); en la T2 los ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), EPA (C20:5 n3) y DHA (C22:6 n3); mientras que en las dos dietas restantes (T3 y T4), que además del AS tenían CLA, predominaron los ácidos mirístico, palmitoleico, esteárico, el CLA, EPA y DHA. En las tres dietas que incluían AS había más EPA (3.6-3.9%) que DHA (0.43-0.51%) y la relación n6:n3 fue de 1.3:1, mientras que en la testigo (T1) fue de 9:1 (cuadro 3).

ÁCIDOS GRASOS EN EL HUEVO

Suplementar las dietas con solo AS supuso cambios significativos en el contenido de AG en el huevo. En el caso de los ácidos grasos: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), eicosapentaenoico (C20:5), docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA) el incremento observado en la yema fue significativo ($P < 0,05$), mientras que la concentración del esteárico (C18:0), linoleico (C18:2 n6), alfa-linolénico (C18:3 n3) y araquidónico (C20:4 n6) se redujo significativamente en comparación con T1 (cuadro 4). La relación n6:n3 disminuyó notablemente, pasando de 11:3 (en T1) a 2:1 (en T2) (cuadro 5). Del total de los n3, más del 80% estaba conformado por la suma de los ácidos grasos EPA+DPA+DHA.

Sin embargo, cuando el CLA fue adicionado a las dietas suplementadas con AS la presencia de los AGS mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en el huevo se incrementó significativamente ($P < 0,05$); lo mismo que la del ácido linoleico conjugado (CLA) y la de los AGn3, EPA (C20:5), DPA (C22:5) y DHA (C22:6) ($P < 0,05$). La relación n6:n3 se redujo aun más con respecto al grupo testigo, pasando de 11.3 (T1) a 1.4 y 1.3 en los tratamientos con AS+CLA (cuadro 5).

La concentración total de CLA en el huevo fue proporcional a la cantidad de CLA adicionada en las dietas ($r = 0,986$). Es decir, que el huevo del T3 presentó un total de 3,3% de CLA, mientras que el huevo del T4 tuvo 5,5% del total de ácidos grasos. Aun cuando en las dietas de ambos tratamientos la proporción de los isómeros del CLA, c9t11 y t10c12 era igual, en la yema predominó el cis 9 trans 11 (cuadro 4).

En general, se observó que suplementar las dietas con AS+CLA incrementó significativamente la cantidad de AGS en el huevo y la de los AGn3, EPA, DPA y DHA, mientras que la concentración de los AGM se redujo notablemente ($P < 0,05$) (cuadro 5).

Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en el huevo de gallinas alimentadas con dietas que incluyen aceite de pescado y ácido linoleico conjugado.

Egg fatty acid composition when laying hens diets were supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Ácidos grasos (% total de ácidos grasos)													
	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2	CLA		C18:3	C20:4	C20:5	C22:5	C22:5	C22:6
							C18:2	C18:2						
n6	c9,t11	t10,c11	n3	n6	n3	n6	n3	n3						
Contraste 1														
T1 vs	0,34	24,62	8,57	2,33	40,9	15,65	0,05	0,02	0,65	1,82	0,02	0,33	0,11	0,77
T2,T3,T4	0,59	30,31	16,43	1,97	29,57	8,63	2,02	0,96	0,34	0,55	0,53	0,05	0,97	3,92
Contraste 2														
T2 vs	0,48	26,90	7,95	3,61	42,66	9,46	0,07	0,12	0,37	0,65	0,41	0,03	0,35	3,12
T3, T4	0,64	32,02	20,66	1,15	23,02	8,22	3,00	1,38	0,32	0,51	0,59	0,05	1,28	4,31
Contraste 3														
T3 vs	0,68	32,45	19,13	1,35	24,56	8,52	2,26	1,01	0,35	0,54	0,59	0,06	1,20	4,48
T4	0,60	31,59	22,20	0,95	21,48	7,92	3,74	1,74	0,30	0,47	0,59	0,05	1,36	4,15
ESM	0,01	0,08	0,09	0,02	0,16	0,05	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,06
<i>P</i>														
Contraste 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
Contraste 3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,794	0,174	0,000	0,001

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2,5%AS, T3-DB+2,5%AS+1%CLA, T4-DB+2,5%AS+2%CLA.
AS-aceite de sardina, CLA- ácido linoleico conjugado.

Cuadro 5. Total de ácidos grasos en el huevo de gallinas alimentadas con dietas que incluyen aceite de pescado y ácido linoleico conjugado.

Egg fatty acid composition when laying hens diets were supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Total AGS	Total AGM	Total AGPI	Total CLA	Total n6	Total n3	Relación n6:n3
Contraste 1							
T1 vs	33,53	43,23	19,42	0,07	17,81	1,55	11,18
T2,T3,T4	47,33	31,54	17,97	2,98	9,23	5,76	1,70
Contraste 2							
T2 vs	35,34	46,27	14,59	0,19	10,14	4,26	2,41
T3, T4	53,33	24,17	19,65	4,37	8,78	6,51	1,35
Contraste 3							
T3 vs	52,26	25,91	19,0	3,28	9,11	6,61	1,38
T4	54,39	22,43	20,31	5,47	8,44	6,40	1,32
ESM	0,10	0,17	0,08	0,01	0,05	0,07	0,11
<i>P</i>							
Contraste 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,711

T1-Dieta base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA, T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA.
AS-aceite de sardina, CLA-ácido linoleico conjugado.

En el huevo, de los cuatro tratamientos no se detectó ninguno de los siguientes AGS: butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), undecanoico (C11:0), láurico (C12:0), tridecanoico (C13:0), heneico-saenoico (C21:0), behénico (C22:0), tricosanoico (C23:0) y lignocérico (C24:0). De igual manera no se detectaron los siguientes AGM: erúxico (C22:1), cis-13,16-docosadienoico (22:2) y nervónico (C24:1).

Otros se detectaron en concentraciones menores al 1% del total de ácidos grasos. Este fue el caso de los AG: mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:1), cis10-pentadecenoico (C15:1), palmitelaídico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), cis10-heptadecanoico (C17:1), elaídico (C18:1), linolelaídico (C18:2), gama-linolénico (C18:3n6), alfa-linolénico (C18:3n3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), cis 11,14 eicosadienoico (C20:2), cis 11,14,17 eicosatrienoico (C20:3), cis 8,11,14 eicatrienoico (C20:3), eicosapentaenoico (C20:5 n3) y docosapentaenoico (C22:5 n6).

VARIABLES PRODUCTIVAS

La suplementación de las dietas únicamente con el aceite de sardina no afectó las variables productivas ($P > 0,05$) (cuadro 6). El color de la yema, lo mismo que las Unidades Haugh se vieron favorecidos ($P < 0,05$) por la adición de AS en la dieta. Sin embargo, cuando el AS se suministró junto con el CLA, cambios significativos fueron observados tanto en las variables productivas como en la calidad física del huevo ($P < 0,05$). Por un lado, la

producción, peso y masa del huevo fueron más bajas cuando se adicionó 1% de CLA a dietas suplementadas con AS, que cuando se incorporó 2% de CLA ($P < 0,05$). La mejor conversión alimenticia se presentó en las aves alimentadas con dietas que contenían AS+2% CLA ($P < 0,05$). Las Unidades Haugh se vieron afectadas en forma negativa al suplementar las dietas con AS+CLA. El color de la yema disminuyó cuando el CLA fue adicionado a las dietas suplementadas con AS ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

ÁCIDOS GRASOS EN ACEITES, DIETA Y HUEVO

La mayor concentración de EPA que DHA encontrada en el aceite de sardina utilizado en este estudio concuerda con lo señalado por Cachaldora y col (2006), en el sentido de que los aceites de sardina tienen más EPA (21%) que DHA (7%); mientras que en los aceites de atún sucede lo inverso (EPA 8% y DHA 21%). Sin embargo, contrario a lo observado en el aceite y las dietas, en la yema hubo una mayor deposición de DHA que de EPA. Esto pudiera estar relacionado con la mayor eficiencia de retención del DHA en los tejidos (Álvarez y col 2004) y con la mayor preferencia que los tejidos tienen por el DHA (González-Esquerri y Leeson 2001). A partir del EPA se forma una amplia variedad de compuestos biológicamente activos conocidos como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), que son potentes reguladores de la actividad

Cuadro 6. Variables obtenidas en gallinas alimentadas con dietas suplementadas con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado. Productive parameters of laying hens fed with diets supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Consumo de alimento (g/ave/día)	Producción de huevo (%)	Peso de huevo (g)	Masa de huevo (g)	Conversión alimenticia*	Unidades Haugh	Color yema
Contraste							
T1 vs	114,95	83,70	67,25	56,45	2,07	74,5	8,74
T2,T3,T4	114,10	82,20	69,22	56,73	2,03	83,05	9,07
Contraste							
T2 vs	117,90	81,45	70,45	56,95	2,11	85,72	9,60
T3, T4	112,20	82,58	68,60	56,62	1,99	81,72	8,81
Contraste							
T3 vs	112,80	78,80	67,10	53,45	2,12	81,36	9,08
T4	111,60	86,35	70,10	59,80	1,85	80,91	8,54
ESM	1,50	1,61	0,55	1,28	0,04	1,24	0,11
P							
Contraste 1	0,641	0,424	0,004	0,846	0,413	0,000	0,007
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000
Contraste 3	0,591	0,001	0,000	0,001	0,000	0,683	0,000

T1-Dieta base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA, T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA.

* kg alimento:kg de huevo.

biológica; este ácido graso puede ser elongado a DPA (C22:5 n3) y luego convertido a DHA (C22:6). Aunque el DHA no posee la capacidad de dar origen a eicosanoides, puede ser retroconvertido a EPA; siendo su aspecto más significativo ser componente estructural de las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina. En estas membranas puede constituir aproximadamente el 60% de los AGPI presentes y es tal su importancia que algunas investigaciones señalan que una deficiencia de este ácido graso puede dar origen a algunas anomalías funcionales (Rice 1999).

La reducción de la relación n6:n3 en el huevo, cuando las dietas fueron suplementadas con AS y CLA, es un aspecto muy importante ya que, como se sabe, dos de los grupos más importantes de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son los n6 y los n3. Estos afectan el metabolismo de los eicosanoides, la expresión génica y la comunicación intercelular y no son interconvertibles en el cuerpo humano. Metabólica y funcionalmente son distintos y en muchos de los casos tienen efectos fisiológicos opuestos. Por tal motivo mantener un balance adecuado n6:n3 es de gran importancia. En este aspecto, se considera que una dieta típica occidental está desbalanceada (10:1), ya que tiene altos niveles de n6 y bajos de n3, lo cual se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, etc. (Gebauer y col 2006). La relación n6:n3 recomendada en una dieta habitual va de 1:1 a 4:1 (Yannakopoulos 2007).

Por otra parte, adicionar 2% de CLA a dietas suplementadas con 2,5% de AS resultó en una reducción de aproximadamente 50% del total de los AGM en el huevo, los cuales fueron reemplazados por AGS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cherian y col (2002) cuando suministraron 2% de CLA + 3% de aceite de menhaden en la dieta de las aves. Álvarez y col (2004) también hallaron un efecto notable en el perfil de ácidos grasos en el huevo cuando suministraron en forma combinada aceite de pescado (0%, 1,4%, 2%) y CLA (1%, 3%, 5%) en la dieta de las aves. Ellos observaron un incremento lineal de los AGS: C14:0, C16:0 y C18:0 y un decremento lineal de C16:1, C18:1 y C18:2.

La explicación a esto radica en el hecho de que la enzima delta 9-desaturasa es la responsable de convertir los ácidos palmítico (C16:0) a palmitoleico (C16:1 n9) y el esteárico (C18:0) a ácido oleico (C18:1n9); sin embargo, el CLA ejerce un efecto inhibitorio sobre esta desaturasa, lo cual ocasionó una reducción en la concentración de los AGM y una acumulación de AGS en el huevo (Cherian y col 2002, Álvarez y col 2004, Huang y col 2008).

Algunos autores han observado que en los lípidos del suero, el CLA incrementa la concentración de los ácidos esteárico, docosatetraenoico y docosapentaenoico, y reduce la del palmitoleico, oleico y di-homo-gamma-linolénico. Al ser el CLA fácilmente incorporado en los fosfolípidos de la membrana celular la síntesis del AA es afectada ya que este ácido graso es reemplazado por el CLA en la misma.

Por lo tanto, la síntesis de eicosanoides a partir del AA se reduce al igual que la actividad de las enzimas delta-6, delta-9 y se presenta un incremento en la actividad de la delta-5 desaturasa (Huang y col 2008).

Se cree que suplementar la dieta de las aves con CLA junto con otra fuente de ácidos grasos como el oleico, linoleico o linolénico revierte estos efectos negativos (Kim y col 2007). Cuando Álvarez y col (2005) suplementaron la dieta para las aves con 2% CLA y 3% de aceite de girasol, observaron un aumento en la concentración de AGM y la disminución de CLA en el huevo.

El que la concentración de los AGn3: EPA, DPA y DHA en el huevo fuese superior cuando las dietas fueron suplementadas con AS+CLA concuerda con las observaciones de otros autores en el sentido de que el CLA mejora la síntesis y deposición de los AGn3 (Du y col 2000, Cherian y col 2002, Raes y col 2002). Emken (1984) menciona que los ácidos grasos 18:1 cis y trans reducen la síntesis de 20:4 y aceleran la síntesis de 20:5 n3 y 20:3 n9.

Por otra parte, fue interesante observar que la concentración de los isómeros de CLA encontrados en el huevo no fue un reflejo de las proporciones de estos en la dieta. La proporción de los isómeros c9, t11 y t10, c12 en las dietas fue casi igual (50% y 50%), sin embargo, en el huevo estas proporciones difirieron notablemente. Esto concuerda con lo señalado por otros autores (Chamruspollert y Sell 1999, Shang y col 2004) quienes encontraron que c9, t11 es el principal isómero que se deposita en yema, constituyendo aproximadamente 50 a 65% del total de CLA en el huevo.

La razón por la cual este isómero se deposita en mayor concentración en el huevo no es muy clara aún, sin embargo se sabe que algunos isómeros son mejor metabolizados que otros (Shang y col 2004), y que la forma trans de los AG es termodinámicamente más estable que la configuración cis, por lo tanto son menos reactivos químicamente (Sadler y Watford 1999).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el CLA tiene un efecto antioxidante, más potente que el alfa-tocoferol y el beta-caroteno (Huang 2008), atribuyéndose esta acción al isómero t10, c12 (Leung y Liu 2000). Es posible que con ello se favoreciera el incremento de n3 observado en el huevo, cuando las dietas fueron suplementadas con AS y CLA. Sin embargo, en esta área falta mucho por estudiar, pues los mecanismos y efectos no son muy claros aún.

En general, un huevo estándar contiene aproximadamente 106 mg de AGn3 (1,3% TAG) en 100 g de huevo completo, de los cuales 48 mg son de ALA (0,6% TAG) y 58 mg de DHA (0,73% TAG); las concentraciones de CLA en el mismo se sitúan en niveles no detectables¹. La ingesta diaria recomendada de EPA+DHA es de 300 a 500 mg/d, para el ALA es de 800 a 1.100 mg/d; y en el caso del CLA, se considera que 3 g/d son necesarios para poder observar efectos benéficos en la salud (Kris-Etherton y col 2002, Aydin 2005). Por lo tanto, las concentraciones de AGn3

¹ www.aeb.org

y de CLA en el huevo alcanzadas en el presente estudio, al suplementar la dieta de las aves con aceite de sardina y CLA, son superiores a un huevo convencional.

VARIABLES PRODUCTIVAS

Diversos autores señalan que al suplementar las dietas para gallinas ponedoras con aceite de pescado, variables como la producción y peso del huevo se ven disminuidas. En el presente estudio, con la adición de 2,5% de AS en la dieta no se observaron tales efectos. Esto concuerda con lo informado por Cornejo y col (2008) y Cherian y col (2007) quienes tampoco encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0,25% y 0,5% de AP en el segundo caso. Asimismo, Cachaldora y col (2006, 2008) no encontraron efecto alguno sobre el peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1,5%, 3%, 4,5% y 6,0%).

Sin embargo, sería conveniente prolongar el tiempo de experimentación para poder determinar los efectos a largo plazo, ya que autores como Hargis y col (1991) observaron efectos negativos en las aves al suplementar la dieta de las aves con aceite de pescado por períodos largos. Otros han observado una disminución en la producción y peso del huevo, atribuyendo tal comportamiento al efecto reductor de los AGn3 sobre la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema) (González-Esquerria y Leeson, 2001, Cachaldora y col 2006). Es posible que otros factores también pudieran estar influyendo en ello, ya que la disminución en el peso del huevo también fue observada por Herber y Van Elswyk (1996) al adicionar una microalga marina con alto contenido de DHA en la dieta de las aves; y por otros investigadores cuando utilizaron sebo (5 a 7%), como única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas y col 2001, González-Muñoz y col 2009).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio al suplementar la dieta con AS + CLA difieren de los observados por Álvarez y col (2004), quienes en su estudio no encontraron efecto alguno sobre las variables productivas de las aves y color de la yema al suplementar la dieta con aceite de pescado (1,4% y 2%) y CLA (1,3 y 5%). En nuestro estudio el incremento en el color de la yema en los tratamientos donde la dieta se suplementó con AS pudo deberse a la presencia de pigmentos presentes en el aceite. Sin embargo, la reducción en el color de la yema observada en los tratamientos T3 y T4, donde las dietas se suplementaron con CLA, fue observada también por Aydin y col (2001).

Por último, es importante señalar que suplementar la dieta de las aves con CLA implicará un incremento en los costos de alimentación y por consecuencia en el huevo, ya que actualmente el kg de CLA (Lutrell Pure granulado)

tiene un costo de \$ 12 USD/kg (comunicación personal). Por lo tanto, habrá que tomar en cuenta este aspecto al momento de formular las raciones.

Se concluye que suplementar la dieta con AS incrementa la concentración de los ácidos grasos omega 3 EPA, DPA y DHA en el huevo, pero adicionar CLA a estas dietas favorece aun más la deposición de estos ácidos grasos en el mismo. Aun cuando la concentración de AGS en el huevo aumenta con la inclusión de CLA en las dietas de las gallinas, la relación n6:n3 se reduce, constituyendo por tanto una alternativa para hacer llegar al consumidor estos compuestos bioactivos.

RESUMEN

Actualmente el consumo regular de ácidos grasos omega 3 (C18:3 ALA, C20:5 EPA, C22:6 DHA) y de ácido linoleico conjugado (C18:2 CLA) es recomendado debido a la importancia que estos compuestos bioactivos tienen en la prevención y control de enfermedades cardiovasculares, diabetes y diferentes tipos de cáncer. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto sobre la composición en ácidos grasos del huevo cuando la dieta de las gallinas es suplementada con aceite de sardina y CLA. 240 gallinas Bovans White fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos con cinco réplicas de 12 aves cada una. Los tratamientos fueron: testigo (T1) con una dieta basal, la misma que T1 más 2,5% de aceite de sardina (T2), la misma que T2 pero adicionando 1% y 2% de CLA (T3 y T4 respectivamente). El ensayo experimental tuvo una duración de cuatro semanas. Al final de este período, 50 huevos de cada tratamiento fueron tomados para realizar la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases. Con respecto al tratamiento testigo, los resultados mostraron un incremento en la concentración total de ácidos grasos omega 3 (1,6% vs 6,0% del total de ácidos grasos) y de CLA (0,7% vs 3-5% del total de ácidos grasos) en el huevo de los tratamientos T3, T4 y T5 en conjunto, y una relación n6:n3 de 11:1 vs 1.3:1 ($P < 0,05$). Se concluye, que al suplementar la dieta de las gallinas ponedoras con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado se obtendrán huevos con doble valor agregado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor, al Programa Texas A&M University-CONACYT por financiar parcialmente este estudio, parte de una tesis doctoral, y a BASF Mexicana por donar el CLA.

REFERENCIAS

- Álvarez C, P Cachaldora, J Méndez, P García-Rebollar, JC De Blas. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci* 45, 524-529.
- Álvarez C, P García-Rebollar, P Cachaldora, J Méndez, JC De Blas. 2005. Effects of dietary conjugated linoleic acid and high-oleic sunflower oil on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci* 46, 80-86.
- AOAC, Association Official of Analyst Chemical. 2000. *Official methods of analysis*. AOAC International, Gaithersburg, USA.
- Aydin R, MW Pariza, ME Cook. 2001. Olive oil prevents the adverse effects of dietary conjugated linoleic acid on chick hatchability and egg quality. *J Nutr* 32, 3105-3112.
- Aydin R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci* 29, 189-195.

- Cachaldora P, P García-Rebollar, C Álvarez, JC De Blas, J Méndez. 2006. Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Brit Poult Sci* 47, 43-49.
- Cachaldora P, P García-Rebollar, C Álvarez, JC De Blas, J Méndez. 2008. Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Anim Feed Sci Tech* 141, 104-114.
- Castillo-Badillo C, J Vázquez-Valladolid, M González-Alcorta, E Morales-Barrera, R Castillo-Domínguez, S Carrillo-Domínguez. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56, 153-159.
- Chamruspollert M, J Sell. 1999. Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks of chickens. *Poult Sci* 78, 1138-1150.
- Cherian G, M Goeger, D Ahn. 2002. Dietary conjugated linoleic acid with fish oil alters yolk n3 and trans fatty acid content and volatile compounds in raw cooked, and irradiated eggs. *Poult Sci* 81, 1571-1577.
- Cherian G, D González, K Ryu, M Goeger. 2007. Long-term feeding of conjugated linoleic acid and fish oil to laying hens; effects on hepatic histopathology, egg quality, and lipid components. *J Appl Poult Res* 16, 420-428.
- Cherian G. 2008. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci* 87, 1131-1137.
- Cornejo S, H Hidalgo, J Araya, J Pokniak. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40, 45-50.
- CPI, Centurion Poultry Incorporated. 2008. Bovans White management guide. Centurion Poultry, Inc. North American Edition, Lexington, USA.
- Du M, DU Ahn, JL Sell. 2000. Effects of dietary conjugated linoleic acid and linoleic: linolenic acid ratio on polyunsaturated fatty acid status in laying hens. *Poult Sci* 79, 1749-1756.
- Emken E. 1984. Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Ann Rev Nutr* 4, 339-376.
- Gebauer SK, TL Psota, WS Harris, PM Kris-Etherton. 2006. N-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl), 1526S-1535S.
- González-Esquerria R, S Leeson. 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult Sci* 79, 1597-1602.
- González-Esquerria R, S Leeson. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can J Anim Sci* 81, 295-305.
- González-Muñoz M, S Bastida, O Jiménez, de C Lorenzo, G Vergara, F Sánchez-Muñiz. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60, 350-359.
- Grobas S, J Méndez, R Lázaro, C de Blas, G Mateos. 2001. Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolk of two strains of laying hens. *Poult Sci* 80, 1171-1179.
- Hargis P, M Van Elswyk, B Hargis. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult Sci* 70, 874-883.
- Herber SM, ME Van Elswyk. 1996. Dietary marine algae promote efficient deposition of n3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poult Sci* 75, 1501-1507.
- Holub B. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Can Med Assoc J* 166, 608-615.
- Huang Y-S, T Yanagita, K Nagao. 2008. Biological effects of conjugated linoleic acid. In: Ching Kuang Chow (ed). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, Pp 825-836.
- Hunter J. 2008. Safety and health effects of trans fatty acids. In: Ching Kuang Chow (ed). *Fatty acids in foods and their health implications*. 3rd ed. CRC Press, USA, Pp 757-790.
- Ip C. 1997. Review of the effects of trans fatty acid, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66, 1523-1529.
- Kim JH, J Hwangbo, NJ Choi, HG Park, DH Yoon, EW Park, SH Lee, Bk Park, YJ Kim. 2007. Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid, with oleic, linoleic, or linolenic acid, on egg quality characteristics and fat accumulation in the egg yolk. *Poult Sci* 86, 1180-1186.
- Kralik G, Z Gajcevic, Z Skrtic. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Ital J Anim Sci* 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106, 2747-2757.
- Leung YH, RH Liu. 2000. Trans 10, cis 12-Conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *J Agric Food Chem* 48, 5469-5475.
- Pariza M, Y Ha. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7, 169-171.
- Raes K, G Huyghebaert, S De Smet, L Nolle, S Arnouts, D Demeyer. 2002. The deposition of conjugated linoleic acids in egg of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *J Nutr* 132, 182-189.
- Rice R. 1999. Fish nutritional value. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Volume II. Academic Press, San Diego, USA, Pp 793-803.
- SAS. Statistical Analysis System. 2008. The SAS System for Windows Release 6.2 USA.
- Sadler M, I Watford. 1999. Health effects of trans fatty acids. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Volume II. Academic Press, San Diego, USA, Pp 769-776.
- Sanhueza C, K Nieto, B Valenzuela. 2002. Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Rev Chil Nutr* 29, 98-105.
- Shang XG, FL Wang, DF Li, JD Yin, JY Li. 2004. Effects of conjugated linoleic acid on the productivity of laying hens and egg quality during refrigerated storage. *Poult Sci* 83, 1688-1695.
- Suksombat W, S Samitayotin, P Lounglawan. 2006. Effects of conjugated linoleic acid supplementation in layer diet on fatty acid compositions of egg yolk and layer performances. *Poult Sci* 85, 1603-1609.
- Watkins B, R Elkin. 1992. Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J Food Comp Anal* 5, 209-215.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: Rainer H, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds). *Bioactive Egg Compounds*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, Pp 159-170.