INTERFERENCIA DE LAS MUCINAS INTESTINALES EN LA DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL DE LA DIGESTA EN CONEJOS

Abad-Guamán R., Romero C., Carabaño R., García J.
Dpto. de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.
Dirección de contacto: javier.garcía@upm.es

INTRODUCCIÓN

Las mucinas son glicoproteínas secretadas por la mucosa intestinal resistentes a la digestión por las enzimas endógenas del animal, están constituidas mayoritariamente por hidratos de carbono (>70%. Mantle y Takore, 1988) y su cuantificación se basa en su precipitación en etanol (Lien et al., 1997). Es un método sencillo y práctico, pero no es muy específico pues el residuo puede estar contaminado con proteínas unidas covalentemente, aunque su importancia cuantitativa parece ser limitada (Leterme et al., 1996, 1998ab), y fibra soluble, pues también precipita en etanol. De acuerdo con Libao-Mercado y Lange (2007) la utilización de este método sería más adecuada en muestras de contenido digestivo que en muestras de mucosa intestinal. La determinación de la concentración de fibra dietética total (FDT) en la digesta ileal podría estar sobrevalorada por la presencia de mucinas intestinales, dado que el etanol que se utiliza en la determinación de la FDT, para precipitar la fibra dietética soluble (FDS), también podría precipitar las mucinas. Este hecho podría explicar la obtención de valores de digestibilidad de FDT y de FDS más bajos de lo esperado o incluso negativos (Graham et al., 1986; Gidenne et al., 1992; Wilfart et al., 2007). De la misma manera, la cuantificación de las mucinas intestinales podría estar sobrevalorada debido a la precipitación de FDS. Los objetivos de este trabajo fueron i) confirmar la presencia de mucinas en la digesta ileal y fecal del conejo, ii) estudiar la forma de cuantificarlas libres de fibra soluble, iii) proponer una corrección para la determinación de FDT libre de mucinas en digesta, y iv) estudiar qué efecto tiene el tratamiento con pectinasa sobre el contenido en FDT de las pectinas de remolacha y manzana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dada la ausencia de un estándar de mucinas de conejo se tomó como referencia una muestra de moco del yeyuno, libre de digesta, obtenida de un conejo afectado por enteropatía epizoótica. Como fuentes de FDT se eligieron las pectinas de pulpa de remolacha (classic RU 301. Herbstreith & Fox), la lignocelulosa (Arbocel RC fine) y un pienso con un 26% de pulpa de remolacha (8,2% de FDS medida como FDT-aFNDmo-pb). Finalmente se tomó una muestra de digesta ileal y fecal de una coneja adulta canulada en ileon. Se determinó el contenido de mucinas en todas las muestras de acuerdo con el método de Lien et al. (1997), adaptado por Romero et al. (2011), basado en la precipitación de las mismas en etanol. El residuo obtenido fue tratado con pectinasa (10 ml de tampón fosfato a 25 ºC con 10 unidades de pectinasa Sigma P2401 e incubación durante la noche) para eliminar el residuo potencial de FDS que pudiera haber precipitado, se volvió a precipitar con etanol. Sobre el residuo de mucinas de las muestras animales se cuantificó el contenido en proteína. Por otra parte, se determinó el contenido en FDT en el moco de conejo. También se determinó la FDT en las pectinas de pulpa de remolacha y manzana (classic AU 201. Herbstreith& Fox), tanto directamente como en muestras a las que se les trató antes de la precipitación final con pectinasa (se añadieron 10 unidades de pectinasa Sigma P2401 y se incubó durante la noche a pH 4.5 y 25 ºC) tras la digestión con amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. La metodología de la AOAC (2000) se utilizó para determinar la MS (934.1), proteína bruta (968.06) y FDT (985.29).

RESUTADOS Y DISCUSION

Las pectinas de pulpa de remolacha, que son casi en su totalidad fibra soluble, mostraron un valor elevado de mucinas (709 g/kg MS), comparable al del moco de conejo (739 g/kg MS. Tabla 1). También se detectaron mucinas en el pienso con pulpa que llevaba remolacha y en la lignocelulosa, si bien en esta última en menor proporción posiblemente debido a su menor contenido en fibra soluble. Estos resultados muestran la falta de especificidad de la

determinación de mucinas mediante precipitación con etanol. Con el fin de evitar la presencia de fibra soluble los residuos de estas muestras se trataron con pectinasa. El residuo que quedó fue próximo a cero en el caso de los alimentos, debido a la hidrólisis de las pectinas lo que evitó su precipitación, mientras que en el caso del moco permaneció prácticamente inalterado (Tabla 1). El efecto del tratamiento con pectinasa fue superior en la muestra ileal que en la fecal (Tabla 1), probablemente debido al menor contenido en FDS en esta última. El contenido en proteína de las mucinas aisladas en ileon y heces fue de un 24,3 y un 21,7% MS, respectivamente. De acuerdo con estos resultados es recomendable realizar un tratamiento con pectinasa cuando se determinen mucinas en muestras que puedan contener fibra soluble. Esta adaptación del método no contempla la eliminación de otros compuestos, como proteínas, que también pueden contaminar el residuo de mucinas intestinales (Piel et al., 2004), pero su eliminación es más compleja (Libao-Mecado y Lange, 2007).

El contenido en FDT del moco de conejo fue de 571 g/kg MS debido a su precipitación con el etanol utilizado en esta metodología. Dada la ausencia de mucinasas comerciales que podrían permitir la hidrólisis de las mucinas en el residuo de FDT, se requiere estudiar alguna forma de descontar el contenido de mucinas del valor de FDT. Para el caso de una muestra de digesta se puede estimar el contenido de moco de la misma a partir de los datos de la Tabla 1, y sabiendo la proporción de moco que es recogida en el residuo de FDT se propone la siguiente corrección para la FDT de la digesta:

$FDT_{Digesta\ corregido}$ (g/kg MS) = $FDT_{digesta}$ (g/kg MS) - FDT_{moco} (g/kg MS),

La FDT procedente del moco se calcula como:

FDT_{moco}= Moco en la digesta (g/kg MS) x 0,571

A su vez, el moco de la digesta se calcula como:

Moco de la digesta=Mucinas de la digesta (g/kg MS)/0,739, donde las mucinas se determinan de acuerdo con Romero et al. (2011).

Dado que la $FDT_{digesta}$ está corregida por proteína hay que expresar la FDT_{moco} libre de proteína. Finalmente, se comprobó cómo la determinación de la FDT de las pulpas de remolacha y de manzana se vio muy afectada por el tratamiento con pectinasa, debido a que la reducción de su peso molecular evitó su precipitación (Tabla 2) (Ku et al., 2003). Este hecho tiene relevancia, dado que las pectinas en la digesta ileal del conejo están en contacto con pectinasas (Marounek et al., 1995), pudiendo ser este un factor de sobreestimación de la digestibilidad ileal y fecal de la fibra soluble.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Association of Official Analytical Chemists. 2000. Official Methods of Analysis 17th ed. AOAC,.Washinton, DC. ● Gidenne, T. 1992. Br. J. Nutr. 67, 133-146. ●Graham, H., Hesselman, K. &Aman, P. 1986. J. Nutr. 116(2):242-251● Ku, Y., Jansen, O., Oles, C.J., Lazar, E.Z. & Rader, J.I., 2003. Food. Chem. 81, 125-132.● Lien, K. A., Sauer, W.C. & Fenton., M. 1997.Z. Ernahrungswiss. 36:182-190 ●Leterme, P., Thewis, A., François, E., van Leeuwen, P., Wathelet, B., Huisman, J., 1996. J. Nutr. 126:2188-2199. ●Leterme P, Froidmont, E., Rossi, F., Thewis, A. 1998a. J. Agric. Food Chem.46, 1927-1934. ●Leterme, P., Seve, B., Thewis, A. 1998b. J. Nutr. 1961-1968. ●Libao-Mercado, A.J., de Lange, C.F.M. Livest.Sci. 109, 141-144.●Mantle, M. &Takore, E. 1988.Bioche. Cell Biol. 66: 1045-1054 ●Marounek, M., Vovk, S. and Skrivanová. Br. J. Nutr. 73, 463-469.●Piel, C., Montagne, L., Salgado, P., Lalles, J.P., 2004.Reprod. Nutr. Dev. 44,419-435 ● Romero, C., Nicodemus, N., Rodriguez, J.D., García, A.I. & de Blas, C., 2011. J. Anim. Sci. 89, 2472-2484● Wilfart, A., Montagne, L., Simmins, P. H., Van Milgen, J. &Noblet, J. 2007. J. Anim. Sci. 85 (4) 976-983.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL2008-00627, por la Comunidad de Madrid S2009/AGR-1704y una beca dela SENESCYT-Ecuador.

Tabla 1. *Determinación del contenido aparente de mucinaspor el método de precipitación con etanol*[a].

Muestras	Mucinas, g/kg MS (CV[b])	Mucinas purificadas con pectinasa, g/kg MS (CV)
Moco de yeyuno de conejo	739 (7,11)	726(6,94)
Contenido ileal de conejo	86,4 (14,9)	74,6 (13,3)
Heces de conejo	10,7 (17,1)	10,3 (20,2)
Pectinas de pulpa de remolacha	709 (9,94)	1,77(19,5)
Pienso con pulpa de remolacha	50,1 (11,3)	0,16(18,5)
Lignocelulosa	5,52 (16,6)	---[c]

[a]Muestras realizadas por triplicado. [b]CV: coeficiente de variación expresado en %.[c] No se realizó debido a la pequeña cantidad de residuo.

Tabla 2. *Fibra dietética total (FDT) realizada con y sin pectinasa en pulpas de remolacha y manzana (media* ± desviación estándar).

Muestras	FDT sin pectinasa, g/kg MS ±de	FDT con pectinasa, g/kg MS ±de
Pectinas de pulpa de remolacha	980 ± 9,82	34,7 ± 24,1
Pectinas de pulpa de manzana	930 ± 5,48	37,8 ± 22,3

INTERFERENCE OF INTESTINAL MUCINS IN THE DETERMINATION OF TOTAL DIETARY FIBRE OF DIGESTA IN RABBITS

ABSTRACT: The aim of this work was to study the potential interference between intestinal mucin and the determination rabbit digesta of total dietary fibre (TDF). Apparent crude mucin was determined in rabbit jejunal raw mucus (free of digesta), ileal digesta, faeces, and three ingredients free of crude mucin [sugar beet pulp pectin, diet containing 26% sugar beet pulp (SBP) and lignocellulose]. After crude mucin analysis the residue obtained from each sample was treated enzymatically with a pectinase to eliminate potential contamination of mucin with soluble fibre. Raw mucus was analyzed for TDF. Raw mucus and SBP pectin showed a similar content in crude mucin (739 and 709 g/kg DM, respectively), but when this residue was treated with pectinase the value for SBP pectin decreased up to 1.8 g/kg DM but remained almost unchanged for raw mucus (726 g/kg DM). Positive but much lower mucin values were also recorded for the diet and lignocelluloses, but they became close to zero after pectinase treatment. Faeces contained lower mucin concentration than ileal digesta (10.7 vs. 86.4 g/kg DM, respectively) and the pectinase barely modified faecal mucins but reduced those of ileal digesta (10.3 vs 74.6% g/kg DM) probably due to its higher soluble fibre content. Protein content of ileal and faecal mucins were 24.3 and 21.7% DM, respectively. Raw mucus contained 571 gTDF/kg DM. The mucin content retained in ileal/faecal TDF might be estimated as: ileal/faecal mucin concentration divided by 0.739 (to obtain the total raw mucus in ileal/faecal digesta), discounted its protein content (as TDF is expressed free of protein), and then multiplying this value by the proportion of mucins retained in TDF analysis (x 0.571).

Keywords: intestinal mucin, total dietary fibre, soluble dietary fibre, rabbits.