# EFECTO DE LA PRE-DIGESTIÓN DEL SUSTRATO SOBRE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* EN CONEJOS

Ocasio-Vega, C., Abad-Guamán, R., Delgado, R., Carabaño, R., Carro, M.D. y García, J.
Dpto. Producción Agraria. ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid. javier.garcia@upm.es

## INTRODUCCIÓN

Los trabajos de fermentación realizados en conejos empleando la técnica de producción de gas *in vitro* desarrollada por Menke *et al*. (1979) presentan grandes variaciones en lo que se refiere a los inóculos utilizados, el procesado de los sustratos, la relación inóculo/sustrato y los modelos matemáticos de ajuste. En muchos trabajos, los sustratos solo son molidos (Calabrò *et al*., 1999; Bovera *et al*., 2006), mientras que en otros se utiliza el residuo insoluble procedente de una pre-digestión *in vitro* donde se simula la digestión del estómago e intestino delgado (Bindelle *et al*., 2007; Rodríguez-Romero *et al*., 2011). Sin embargo, al estudiar la fermentación de alimentos fibrosos sería interesante conservar en la muestra la fracción de la fibra que se solubiliza en el intestino delgado (Abad-Guamán *et al*., 2015). Por otra parte, en conejos se ha observado que el nivel y tipo de fibra de la dieta de los donantes influye sobre la fermentación *in vitro* (Rodríguez-Romero *et al*., 2011). El presente trabajo compara la fermentación *in vitro* de diferentes sustratos cuando se realiza una pre-digestión o se incuba directamente el sustrato utilizando cecótrofos procedentes de gazapos alimentados con dos niveles de fibra soluble (FS).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 gazapos (neozelandés × californiano), destetados a los 34 días de edad y asignados al azar a dos piensos experimentales que difirieron en el nivel de FS (84,0 vs. 130,0 g/kg de materia seca, obtenidos remplazando paja y salvado por pulpa de remolacha), ambos con un contenido en proteína bruta, fibra neutro detergente y grasa de 16,9, 31,0 y 5,1%, respectivamente. Los gazapos tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al pienso y no fueron medicados. A los 41 d de edad (1,13 ± 0,005 kg de peso vivo), a los conejos se les colocó un collar de plástico desde las 9:00 h hasta las 10:00 h (como máximo) para recoger los cecótrofos excretados. Para la realización de la fermentación *in-vitro* se usaron cuatro sustratos fibrosos de características diferentes: celobiosa, pectinas de remolacha, pulpa de remolacha y paja (Tabla 1). De cada sustrato se pesaron 0,250 g, por duplicado, en botellas de vidrio de 115 ml. Antes de la fermentación, los sustratos de la mitad de las botellas se sometieron a una pre-digestión *in-vitro* de dos pasos que simula la digestión en el estómago y en el intestino delgado, según el método propuesto por Abad *et al*. (2013), pero con la variación de que no se realizó una filtración y todo el contenido de las botellas se utilizó como sustrato para la incubación *in vitro*. A los sustratos no pre-digeridos se les añadieron 13.5 ml de solución tampón para igualar el volumen en todas las botellas. Una vez realizada la pre-digestión del sustrato, se guardaron todas las botellas (con si y sin pre-digestión) a una temperatura de 4°C, para detener la degradación de los sustratos. Los cecótrofos se mezclaron con el medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970; sin tripticasa), en proporción de 720 mg de cecótrofos por 100 ml de medio, y se homogeneizó (2 min; Larrea, 2013). Los viales se dosificaron con 25 ml de la mezcla mediante una bomba peristáltica, se cerraron con tapones de goma y se incubaron a 40ºC durante 144 h.

La producción de gas (PG) se midió a las 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 47, 59, 71, 95, 120 y 144 h de incubación mediante un transductor de presión y una jeringa graduada, permitiendo la salida del gas tras cada medida. Estos valores se corrigieron con el valor de gas producido en sus respectivos blancos (blancos pre-digeridos y blancos sin pre-digestión). Los datos de producción de gas fueron ajustados a un modelo logístico descrito por Schofied *et al*. (1994): $PG = Vf / [1+ e^{[2 - 4\,k\,(t-L)]}]$, donde Vf es la producción potencial de gas, k es la tasa fraccional media de producción de gas, L es el retraso inicial en el inicio de la producción de gas y t es el tiempo de medida. Estos parámetros se estimaron utilizando el procedimiento NLIN de SAS. La tasa fraccional máxima de producción de gas ($\mu_m$) y el tiempo en el que $\mu_m$ es alcanzada ($t_i$) se calcularon como: $\mu_m = k \times Vf$ y $t_i = L + (Vf / (2 \times \mu_m))$, respectivamente (Schofied *et al*., 1994). Los datos de producción de gas se analizaron utilizando un modelo mixto que incluyó como efectos fijos el efecto pre-digestión (sí o no), el

tipo de pienso (baja o alta FS), el tipo de sustrato y sus interacciones, mientras que el conejo donante (inóculo) se incluyó como un efecto aleatorio. Cuando se detectaron efectos significativos (P<0,05), las medias se compararon mediante un test de Tukey.

***Tabla 1**. Composición química (g/kg de materia seca) de los sustratos utilizados (valores corregidos por sus contenidos en cenizas y proteína)*

| | Pectinas | Pulpa de remolacha | Paja |
|---|---|---|---|
| Fibra dietética total | 934 | 646 | 785 |
| Fibra neutro detergente | 6,4 | 369 | 748 |
| Fibra ácido detergente | 1.5 | 244 | 425 |
| Lignina ácido detergente | 0 | 9,14 | 46,5 |
| Fibra soluble | 928 | 278 | 37,2 |
| Proteína bruta | 53,1 | 86,3 | 28,0 |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pre-digestión de los sustratos aumentó (P≤0,029) el volumen de gas producido y la tasa fraccional de producción de gas media y máxima (k y $\mu_m$) en comparación con la no realización de la digestión previa (Vf: 198 *vs*. 170 ml/g MS, k: 0,042 *vs.* 0,032 %/h y $\mu_m$: 9,79 *vs.* 5.96 ml/h), redujo los valores de $t_i$ (30.4 vs. 37.2 h), y tendió a reducir el L (13,1 *vs*. 15,8 h; P=0,065). Por otro lado, el nivel de FS del pienso no modificó la producción de gas, y únicamente al utilizar cecótrofos de gazapos que consumieron la dieta baja en FS, aumentaron (P≤0,003) los valores de k y $\mu_m$, y tendió a disminuir el valor de $t_i$ (P=0,056), lo que difiere de lo observado por Rodríguez-Romero *et al*. (2011). La combinación de predigestión e inóculo procedente de gazapos alimentados con el nivel bajo de FS aumentó $\mu_m$ (P<0,05), no observándose efectos para el nivel alto de FS ni para el resto de parámetros medidos. El tipo de sustrato afectó a todos los parámetros de la fermentación (P<0,001), si bien las diferencias dependieron de la realización de la predigestión y/o del nivel de FS.

En las Figuras 1A y 1C se muestran las curvas de producción de gas para cada el tipo de inóculo. La celobiosa pre-digerida al fermentarse con el inóculo obtenido de los gazapos alimentados con el pienso bajo en FS presentó la mayor producción de gas en comparación con los demás sustratos (Figuras 1A y 1B). Sin embargo, con el inóculo de los conejos que recibían el pienso alto en FS, la producción de gas tendió a ser más baja y similar a la de las pectinas pre-digeridas. Este efecto podría estar relacionado con algún cambio en la estructura química de la celobiosa tras la digestión *in vitro* que pudiera modificar su utilización por parte de la microbiota. En este sentido, Bobleter *et al*. (1986) observaron que la celobiosa puede hidrolizarse en un ambiente acido, a un pH entre 2 y 3, que es similar al alcanzado en la primera parte de la pre-digestión realizada en este estudio. Por otra parte, trabajos realizados en ratas, han observado que la celobiosa es digerida a nivel de intestino delgado mediante la acción de la β-galactosidasa (Morita *et al*., 2008) y la celobiosidasa presente en el intestino de herbívoros (Nakaruma, 2005). Si bien no sería esperable que la pancreatina utilizada en la digestión *in vitro* contuviera estas enzimas, habría que confirmar su ausencia. Por el contrario, las pectinas predigeridas y fermentadas con el inóculo de los gazapos alimentados con el pienso alto en FS presentaron mayores valores de k y $\mu_m$ (P < 0,05), pero este efecto no se observó con el inóculo obtenido con el pienso bajo en FS. Los efectos observados en la celobiosa y las pectinas indican que llevar a cabo un proceso de pre-digestión modifica la cinética de fermentación de la materia orgánica y que este proceso depende del tipo de microbiota presente en el inóculo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Abad, R., *et al*. 2013. Anim. Feed Sci.182: 61- 70 • Abad-Guamán, R., *et al*. 2015. J. Anim. Sci. 93: 2860–2871 • Bindelle, J., *et al*. 2007. Anim. Feed Sci. Technol. 132: 111–122 • Bobleter, O., *et al*. 1986. J. Carboh. Chem. 5: 387-399 • Bovera, F., *et al*. 2006. Asian Australas. J. Anim. Sci. 19: 1649–1657 • Calabrò, S., *et al*. 1999. World Rabbit Sci. 7, 197-201 • Goering, H.K. & P.J. Van Soest. 1970. USDA Agricultural Research Service. Agric. Handbook No. 379 • Larrea, J.A. 2013. Trabajo Fin de Máster, UPM • Menke, K.H., *et al*. 1979. J. Agric. Sci. 93: 217- 222; • Morita, T., *et al*. 2008. Nutr. 24: 1199–1204 • Nakamura,

S., *et al*. 2005. Nutr. 21: 1158–1159 • Rodríguez-Romero, N., *et al*. 2011. World Rabbit Sci. 19: 85–94 • Schofield, P., *et al*. 1994. J. Anim. Sci. 72: 2980-2991.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos AGL2015-66485-R y AGL2011-22628, financiados por el MINECO.

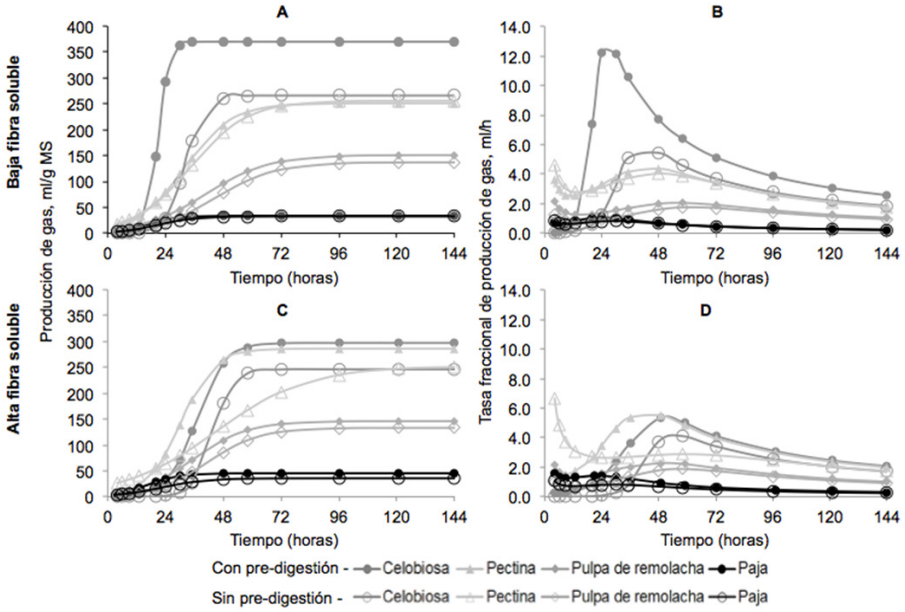



***Figura 1**. Efecto del procesado del sustrato (con o sin pre-digestión) sobre la cinética de producción de gas (figuras A y B) y la tasa fraccional de producción de gas (B y D) de cuatro sustratos incubados con cecótrofos de conejos alimentados con piensos con dos niveles de fibra soluble (baja o alta).*

## EFFECT OF SUBSTRATE PRE-DIGESTIÓN ON THE *IN VITRO* FERMENTATION USING SOFT FAECES OF RABBITS AS INOCULUM

**ABSTRACT:** This study evaluated the influence of an *in vitro* pre-digestion of substrate on *in vitro* gas production using soft faeces from rabbits fed two diets as inoculum. Eight hybrid rabbits were fed two diets containing either low (LSF) or high soluble fibre (HSF) level (84.0 vs. 130 g/kg DM). Cellobiose, sugar beet pectin, sugar beet pulp, and wheat straw were used as substrates. Substrates in half of the batch cultures were subjected to an enzymatic pre-digestion procedure before incubation at 40ºC, and gas production was measured at different time points from 2 to 144 h. Substrate pre-digestion resulted in greater ($P \leq 0.029$) values of potential gas production (Vf) and mean (k) and maximum ($\mu_m$) fractional rates of gas production compared with the undigested substrates, but pre-digestion x substrate interactions ($P < 0.05$) were observed for Vf, L (initial delay in the onset of gas production) and $\mu_m$. Cellobiose and pectins were the substrates more affected by the pre-digestion and no influence of pre-digestion on gas production was observed for wheat straw. The LSF-inoculum resulted in greater values of k and $\mu_m$ compared with the HSF-inoculum, but there were no differences between inocula in Vf and L values. The results indicate that a pre-digestion of substrate can modify the kinetics of gas production, but the changes depend on both the incubated substrate and the type of microbiota in the inoculum.

**Keywords***: in vitro* digestion, *in vitro* gas production, soluble fibre, rabbit.