EFECTO DE LA PRE-DIGESTIÓN DEL SUSTRATO SOBRE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES *IN VITRO* UTILIZANDO CECÓTROFOS DE CONEJOS

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

INTRODUCCIÓN

En la técnica de producción de gas *in vitro*, la cantidad de gas producida está muy relacionada con la producción de ácidos grasos volátiles (AGV; Beuvink y Spoelstra, 1992). La aplicación de esta técnica *in vitro* al estudio de la fermentación cecal en el conejo aún no está estandarizada y no se ha establecido claramente el tipo de inóculo que se debe utilizar, el procesado de los sustratos o el ratio inóculo/sustrato. En el ciego del conejo, el nivel y el tipo de fibra influyen sobre la cantidad de AGV producidos y sus proporciones molares (García *et al*., 2002). Sin embargo, es necesario realizar modificaciones importantes en el nivel y tipo de fibra para observar cambios relevantes en la concentración cecal de AGV *in vivo* (García *et al*., 2000), debido a que ésta es un reflejo del balance existente entre la producción y la absorción (Vernay, 1975). Por este motivo, la técnica de fermentación *in vitro* podría ser útil para el estudio de los cambios cualitativos que produce el tipo de alimento sobre la cantidad y perfil de AGV producidos. Para evaluar *in vitro* la fermentación cecal, es importante considerar que hay una parte de la fibra que se solubiliza a nivel ileal. Este trabajo evalúa cómo se ve afectada la producción de AGV *in vitro* al realizar una pre-digestión de los sustratos, usando como inóculo cecótrofos de gazapos alimentados con dos niveles de fibra soluble (FS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 gazapos (neozelandés × californiano) destetados a los 34 días de edad, que fueron asignados al azar a dos piensos experimentales que diferían en el nivel de fibra soluble (84,0 *vs.* 130,0 g/kg de materia seca, obtenidos remplazando paja y salvado por pulpa de remolacha) y contenían 16,9% proteína bruta, 31,0% fibra neutro detergente y 5,1% grasa. A los 41 días 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 las incubaciones *in vitro* se usaron cuatro sustratos fibrosos de características diferentes: celobiosa, pectinas de remolacha, pulpa de remolacha y paja. La composición de los sustratos y la metodología de las incubaciones se describe en detalle en Ocasio-Vega *et al*. (2017). Brevemente, se usaron viales de vidrio de 115 ml en los que se pesaron 0,250 g de cada sustrato por duplicado. La mitad de los viales se sometieron a una pre-digestión *in vitro* que simula la digestión en el estómago y el intestino delgado (Abad *et al*., 2013) y se incluyeron viales sin sustrato (blancos), la mitad de los cuales fueron procesados de la misma forma. Los cecótrofos se mezclaron con un medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970; sin tripticasa), en proporción 720 mg de cecótrofos por 100 ml de medio, y se homogeneizó la mezcla antes de dosificar 25 ml en cada vial. Los viales se cerraron y se incubaron a 40ºC durante 144 h para determinar la cinética de producción de gas, cuyos resultados han sido descritos por Ocasio-Vega *et al*. (2017). A las 25 h, se tomó 1 ml de muestra del contenido de cada vial utilizando una jeringa de insulina, se acidificó (20 µl H_2SO_4 al 10%; vol/vol) y se congeló a -20ºC hasta el análisis de su concentración en AGV por cromatografía de gases según Carro *et al*. (1992).

Las concentraciones de AGV se analizaron utilizando un modelo mixto que incluyó como efectos fijos la pre-digestión, el tipo de pienso, el sustrato y sus posibles interacciones, mientras que el conejo donante (inóculo) se incluyó como efecto aleatorio. Cuando se detectaron efectos significativos ($P < 0,05$), las medias se compararon mediante un test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción total de AGV en los blancos pre-digeridos fue mayor (P < 0,001) que en los blancos no pre-digeridos (6,53 *vs*. 5,31 mM). Los blancos pre-digeridos mostraron menores (P = 0 ,004) proporciones de acetato (91,1 *vs.* 97,5%) y mayores (P ≤ 0,02) de butirato e isovalerato (3,39 *vs.* 0,99% y 3,82 *vs.* 0,86, respectivamente). Sin embargo, la dieta de los conejos donantes no afectó (P > 0,05) a la producción de AGV en los blancos ni a las proporciones molares de los principales AGV. Las diferencias observadas entre los blancos pre-digeridos y sin pre-digerir se atribuyeron a la fermentación de las enzimas añadidas en la pre-digestión, por lo que las concentraciones de AGV en los viales con muestra se corrigieron con el valor de los respectivos blancos (pre-digeridos y sin pre-digerir).

La pre-digestión no afectó a la producción total de AGV (10,2 *vs.* 8,99 mM en los viales pre-digeridos y no pre-digeridos, respectivamente), pero modificó el perfil de AGV. Cuando se realizó la pre-digestión la proporción molar de acetato disminuyó (P < 0,001; 98,8 *vs.* 87,1%), mientras que las proporciones de propionato, butirato, isobutirato e isovalerato aumentaron (P ≤ 0,006) respecto a los viales no pre-digeridos. Los resultados indican que el tratamiento enzimático (pepsina-pancreatina) usado en la pre-digestión podría modificar la estructura química de los sustratos y cambiar su aprovechamiento por la microbiota intestinal. Curiosamente, el inóculo procedente de conejos alimentados con el pienso bajo en FS, y por ello con menor contenido en fibra fermentable (Delgado *et al*., 2015), produjo mayor cantidad de AGV (11,1 *vs.* 8,0 mM; P = 0,013), aumentó la proporción de butirato (P = 0,046) y tendió a bajar la proporción de propionato e isovalerato (P ≤ 0,073), en comparación con el inóculo de los conejos que consumieron el pienso alto en FS. Sin embargo, la interpretación de estos resultados es compleja, ya que existieron interacciones (P < 0,05) pre-digestión x sustrato y tipo de dieta x sustrato para la producción de AGV y las proporciones molares de acetato y butirato, debidas principalmente al comportamiento de la celobiosa. En la Figura 1 se observa que parte de los efectos anteriormente comentados se deben a la tendencia a producir más AGV cuando se fermentó la celobiosa con el inóculo de gazapos alimentados con el pienso bajo en FS (P = 0,13). Esta misma tendencia también se observó con el inóculo obtenido con el pienso alto en FS, si bien la cantidad de AGV producida se redujo a la mitad con respecto al inóculo con alto nivel de FS. Esto sugiere la existencia de perfiles microbianos distintos en función del tipo de pienso suministrado, como ha sido previamente observado por Delgado *et al*. (2015) utilizando los mismos piensos. Por el contrario, la paja predigerida con el inóculo obtenido con baja FS produjo menos cantidad de AGV (P < 0,05), no observándose efecto con las pectinas, ni con la pulpa de remolacha. Además, la combinación de la predigestión de la celobiosa con el inóculo procedente del pienso con baja FS, produjo un cambio drástico en el perfil de AGV, ya que aumentó la proporción de butirato a costa de la de acetato (P < 0,05). El perfil de AGV obtenido a partir de pulpa de remolacha y de la paja también fue modificado por la pre-digestión, si bien en menor medida que con la celobiosa. En ambos casos, también se redujo el acetato producido, observándose un incremento en el butirato.

Estos resultados indican que el tratamiento de los sustratos con pepsina-pancreatina previo a su fermentación *in vitro* con cecótrofos altera la cantidad y/o tipo de sustratos fermentables por los microorganismos cecales, afectando al perfil de AGV producidos. Sin embargo, el nivel de fibra soluble en el pienso únicamente afectó a la producción de AGV cuando se incubó celobiosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Abad, R., *et al*. 2013. Anim. Feed Sci.182: 61- 70 • Beuvink, J.M.W. & Spoelstra, S.F. 1992. Appl Microbiol Biotechnol 37: 505. • Carro, M.D., *et al*. 1992. Anim. Feed Sci. Technol. 37: 209-220. • Delgado, R., *et al*. 2015. World Rabbit Sci. 23:131. • García, J., *et al*. 2000. J. Anim. Sci. 78, 638-646. • García, J., *et al*. 2002. Anim. Res. 51: 165–173. • Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. USDA Agricultural Research Service. Agric. Handbook No. 379 • Ocasio-Vega, C., *et al*. 2017. AIDA XVII Jornadas sobre producción animal. • Vernay, M., *et al*. 1975. Ann Rech Vet. 6: 369-77.

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

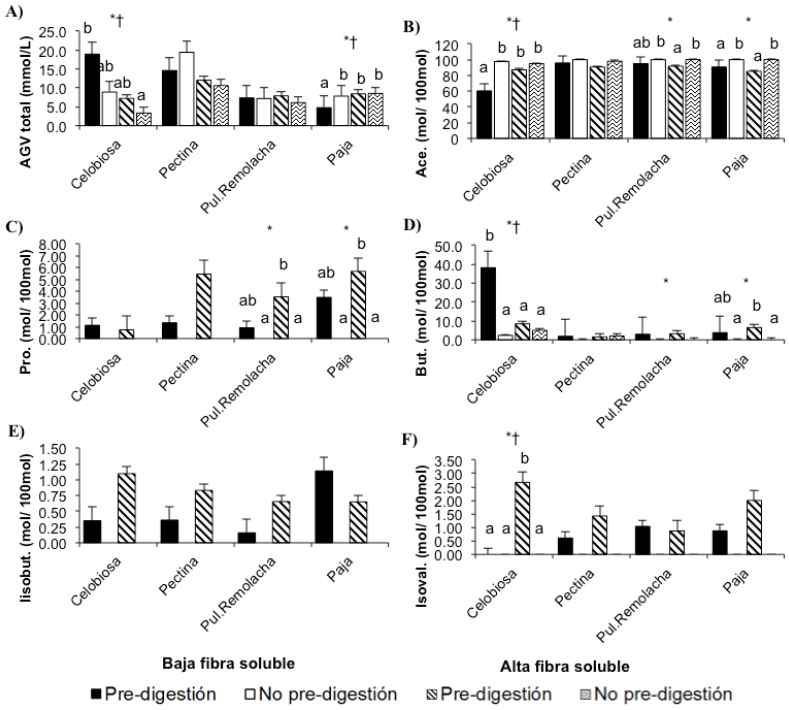


***Figura 1**. Influencia de la pre-digestión y la dieta de los conejos donantes (Baja o Alta fibra soluble) en la producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) y sus proporciones molares en la fermentación cecal in vitro de celobiosa, pectina, pulpa de remolacha y paja (n = 4)*
[a, b]: dentro de cada sustrato, indica diferencias entre columnas (P < 0,05).
*En cada sustrato, * indica efecto de la pre-digestión y † indica efecto del inoculo (P < 0,05).*

EFFECT OF SUBSTRATE PRE-DIGESTION ON THE *IN VITRO* VOLATILE FATTY ACIDS PRODUCTION USING SOFT FAECES OF RABBITS

ABSTRACT. The influence of substrate pre-digestion and donors' diet on *in vitro* volatile fatty acid (VFA) production by rabbits' soft faces was investigated. Eight hybrids rabbits were assigned to two diets containing low (LSF) or high soluble fibre (HSF) levels (84.0 *vs.* 130 g/kg DM). Cellobiose, sugar beet pulp, sugar beet pectin and wheat straw were used as substrates. Substrates in half of the cultures were subjected to an *in vitro* enzymatic pre-digestion procedure before incubation at 40ºC. VFA production was determined at 25 h incubation in all cultures and values were corrected with their corresponding blanks (with or without pre-digestion). Pre-digested cultures showed greater (P < 0.05) proportions of butyrate and lower (P < 0.001) acetate proportions, but total VFA production was unaffected (P = 0.34). The LSF-inoculum increased (P < 0.05) VFA production and butyrate proportions. Pre-digestion × substrate and donors' diet × substrate interactions (P < 0.05) were observed for VFA production and the proportions of acetate and butyrate, being the cellobiose the most affected substrate by the pre-digestion and donors' diet. The results indicate that both the pre-digestion process and donor' diet can influence *in vitro* VFA production in rabbits, but the effects varied with the incubated substrate.

Keywords*: in vitro* digestion, *in vitro* caecal fermentation, volatile fatty acids, rabbit.