

FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE PEPSINA/PANCREATINA CON INÓCULO DE CONEJOS

Abad-Guamán, R., Carro, M.D., Larrea-Dávalos, J.A., Vanegas, J., Ocasio-Vega, C.E., Carabaño, R. y García, J.

Dpto. de Producción Agraria. E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid
javier.garcía@upm.es

INTRODUCCIÓN

La inclusión de fibra soluble/fermentable en los piensos de conejos aumenta la cantidad de células caliciformes en la mucosa del yeyuno y el flujo ileal de mucinas (Castillo, 2013; El Abed et al., 2011). Estas son fermentadas casi en su totalidad en el ciego, representando hasta una tercera parte de la fibra fermentada en este compartimento (Abad-Guamán et al., 2015), pudiendo influir sobre la composición de la microbiota cecal. Las sustancias endógenas que llegan al ciego, además de mucinas, incluyen enzimas, descamaciones epiteliales, sales biliares, etc., que previsiblemente podrían ser fácilmente fermentadas por la microbiota del conejo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la fermentabilidad de la fracción enzimática que forma parte de las sustancias endógenas (utilizando proteasas y pancreatina usadas en la determinación de la digestibilidad *in vitro* propuesto por Ramos et al., 1992) empleando distintos inóculos (contenido ileal, cecal, y cecótrofos) de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1: En 12 botellas de 115 ml se agregaron 6,25 ml de buffer fosfato A (0,1 M; pH 6), 2,5 ml de HCL 0,2 M y 0,5 ml de solución de pepsina (25 mg de pepsina/ml HCl 0,2 M). Se incubó 1,5 h a 40°C. Posteriormente, se añadieron 2,5 ml de buffer B (0,2 M; pH 6,8), 1,25 ml de NaOH 0,6 M y 0,5 ml solución de pancreatina (100 mg de pancreatina/ml buffer B). Se incubó 3,5 h a 40°C. Este proceso es utilizado habitualmente para realizar la predigestión de las muestras que se someterán a una fermentación *in vitro*. Finalizado el mismo, el volumen completo (sin filtrar) se utilizó como sustrato para su fermentación *in vitro*. Paralelamente a esto se prepararon blancos para cada sustrato en botellas de 60 ml, los cuales no recibieron el procesado anteriormente descrito (blancos sin pepsina/pancreatina). Se utilizaron 3 inóculos de íleon y 3 de ciego, cada uno de los cuales se obtuvo mezclando el contenido ileal o cecal de 3 gazapos de 70 días de edad inmediatamente tras su sacrificio.

Experimento 2: Se utilizaron 8 inóculos de cecótrofos procedentes de 8 animales de 40 días de edad. A los gazapos se les colocó un collar de plástico desde las 8:00 h hasta las 10:00 h (como máximo) para recoger los cecótrofos producidos una vez excretados. Se procedió como en el experimento 1, utilizando botellas de 115 ml en todos los casos. En ambos experimentos cada uno de los inóculos se mezcló con el medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970; sin tripticasa) en la proporción necesaria para aportar 62,5 mg en materia seca de inóculo por botella (250 mg de contenido cecal, 375 mg de íleon y 180 mg de cecótrofos en materia fresca) y se dosificaron 25 ml de la mezcla en cada botella mediante una bomba peristáltica. Las botellas se incubaron a 39°C y se midió la producción de gas a las 2, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 47, 59, 71, 95, 120 y 144 horas de incubación mediante un transductor de presión y una jeringa graduada, permitiendo la salida del gas tras cada medida. Los datos de producción de gas se ajustaron a un modelo empírico sigmoideo (Groot et al., 1996).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 y Figura 1A se describen los parámetros de la modelización de la cinética de producción de gas obtenido en el experimento 1. No se observó ninguna diferencia entre los inóculos ileales y cecales ($P > 0,50$). Lo que se detectó es una alta capacidad de la microbiota del conejo para utilizar la mezcla de pepsina y pancreatina. Esto se ve reflejado en la diferencia existente en el máximo volumen potencial de producción de gas entre el blanco con y sin pepsina/pancreatina (54 vs. 16 ml/botella; $P < 0,001$). Además, el pH final de los residuos de la fermentación fue más bajo en las botellas que contenían los blancos con pepsina/pancreatina (6,49 vs. 7,74; $P < 0,001$), resultado de una mayor actividad fermentativa. El tiempo necesario para alcanzar el máximo volumen potencial es muy corto ($2 \times B < 13$ h). Las curvas de producción de gas de los blancos con endógeno se ajustaron

mejor a un modelo exponencial, dado que los valores de C de la cinética de producción de gas son menores a 1 (0,75) (Groot *et al.*, 1996). Estos resultados confirman la existencia de una microbiota capacitada para fermentar este tipo de sustrato proteico, incluso en el íleon. Sin embargo, en el íleon la fermentación podría estar limitada por el reducido tiempo de retención de la digesta (Lebas, 1979).

Tabla 1. Comparación de parámetros de la modelización de la cinética de producción de gas, y pH final del contenido de las botellas

Inóculo	Íleon		Ciego		EEM (n=3)	P-valor		
	Sí	No	Sí	No		Pepsina /pancreatina	Inóculo	Pesina/pancreatina × Inóculo
V ¹	52,5 ^a	17,1 ^b	54,4 ^a	15,3 ^b	1,98	<0,001	0,97	0,37
B ²	4,53	6,23	4,09	4,91	1,13	0,21	0,36	0,64
C ³	0,745	2,47	0,759	1,31	0,819	0,20	0,50	0,49
pH	6,49 ^c	7,69 ^b	6,49 ^c	7,80 ^a	0,023	<0,001	0,035	0,032

^{a-c} Medias entre filas con diferentes superíndices son diferentes significativamente; $P < 0,05$.

¹ Máximo potencial de producción de gas, ml/botella.

² Tiempo en el cual ocurre V/2, h.

³ Valor que cambia simultáneamente con B y determina la forma de la curva.

Cuando se utilizaron como inóculo los cecótrofos también se observaron diferencias en los volúmenes potenciales alcanzados entre los blancos con o sin pepsina/pancreatina (15,4 vs. 4,85 ml; $P < 0,001$. Figura 1B y Tabla 2). Las diferencias entre los valores absolutos existentes entre ambos experimentos pueden deberse a la edad de los animales y el tipo de inóculo. En todo caso, las diferencias observadas entre la fermentación sin y con pepsina/pancreatina utilizando inóculos procedentes del íleon, ciego y cecótrofos se mantuvieron, produciendo 3 veces más gas los blancos que tuvieron pepsina/pancreatina respecto a los que no se les añadió.

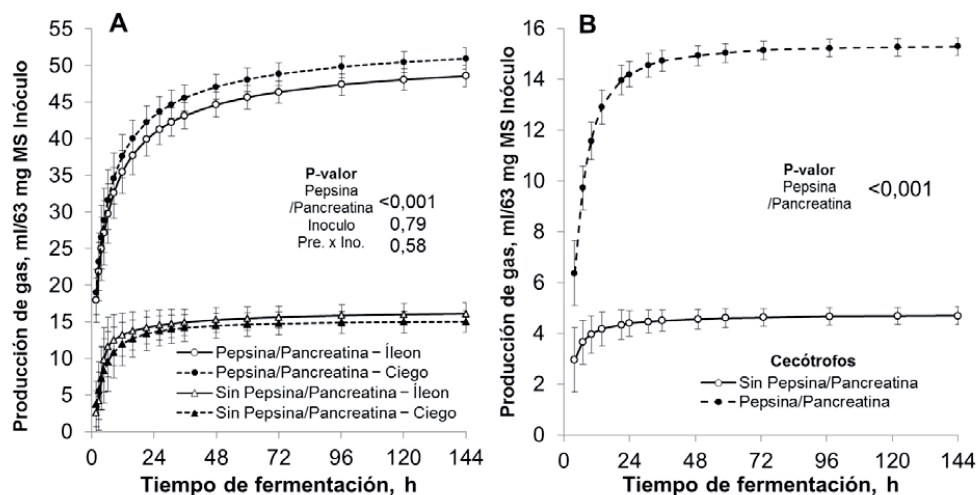


Figura 1. Medias \pm error estándar de la (A) cinética de producción de gas con inóculos ileales y cecales (animales de 70 d de edad) de dos tipos de blancos (con o sin pepsina/pancreatina) y (B) con cecótrofos como inóculo de animales de 40 d de edad

Tabla 2. Comparación de los parámetros de la cinética de producción de gas, y pH final del contenido de las botellas utilizando cecótrofos de gazapos de 40 d de edad

	Pepsina/pancreatina		EEM (n=8)	P-valor
	Sí	No		
V ¹	15,4	4,85	0,464	<0,001
B ²	4,86	3,08	0,508	0,027
C ³	1,60	1,34	0,204	0,388
pH	7,21	7,85	0,026	<0,001

¹ Máximo potencial de producción de gas, ml/botella.

² Tiempo en el cual ocurre V/2, h.

³ Valor que cambia simultáneamente con B y determina la forma de la curva.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad-Guamán, R. Carabaño R., Gómez-Conde M.S. & García J. 2015. Enviado J. Anim. Sci. • Castillo, C. 2013. Tesis de Máster. IAMZ. • El Abed N., Delgado R., Abad R., Romero C., Fernández A., Villamide M.J., Menoyo D., García J. & Carabaño R. 2011. Actas 62 Congreso EAAP, pp. 159. • Goering, M.K. & Van Soest, P.J. 1970. Agricultural Handbook, Nº. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington DC. • Gómez-Conde M.S., García J., Chamorro S., Eiras P., Rebollar P.G., Pérez de Rozas A., Badiola I., de Blas C. & Carabaño R. 2007. J. Anim. Sci. 85:3313-3321. • Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. & Lantinga, E.A. 1996. Anim. Feed Sci. Technol. 64: 77-89. • Lebas, F. 1979. Cuniculture, 6 :67-68. • Ramos M.A., Carabaño R. & Boisen S. 1992. World Rabbit Sci. 15: 938-946.

Agradecimientos: Proyectos AGL2011-22628 (MICINN) y MEDGAN ABI-2913 (Comunidad de Madrid). R. Abad-Guamán disfruta de una beca del SENESCYT-Ecuador.

IN VITRO FERMENTATION OF PEPSIN/PANCREATIN WITH RABBIT INOCULA

ABSTRACT: The *in vitro* gas production of pepsin/pancreatin used in the determination of *in vitro* digestibility was evaluated using different inocula from rabbits (ileal, caecal and soft faeces from rabbits). In experiment 1 were used 3 different ileal and caecal inocula obtained each one from the combination of the digesta of 3 different 70 d old rabbits. In experiment 2 were used 8 inocula (soft faeces) from 8 rabbits (40 d old). In both experiments were added to each bottle 12.5 g of pepsin and 50 g of pancreatin and was compared with others in which no pepsin/pancreatin was added. Gas production curves were adjusted to an empiric sigmoid model. Both ileal and caecal microbiota showed a high capacity to ferment pepsin/pancreatin, as it was observed from the difference asymptotic gas production with and without pepsin/pancreatin (54 vs. 16 ml/bottle; P<0.001) and their lower final pH (6.49 vs. 7.74; P<0.001). No difference between ileal and caecal inocula was observed (P>0.50). Time necessary to reach the asymptotic gas production was short ($2 \times B < 13$ h). The difference in the asymptotic gas production was also observed when soft faeces were used as inocula (15.4 vs. 4.85 ml; P<0.001). *In vitro* fermentation with pepsin/pancreatin rendered threefold the amount of gas than without them, independently of the type of inocula, and confirms the capacity of intestinal microbiota to ferment this fraction even.

Keywords: *in vitro* gas production, enzymes, endogenous fermentation, rabbit.