

UTILIZACIÓN DE BOLSAS ANKOM® EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA *in vitro* EN CONEJOS

Abad R., García J., Ibáñez M., Rodríguez J.D., Menoyo D., y Carabaño, R.
Dpto. de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.
Correo electrónico: rosa.carabano@upm.es

INTRODUCCIÓN

La metodología de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DMS_{iv}) desarrollada por Ramos et al. (1992) para predecir la digestibilidad de la materia seca y valor nutricional de diferentes alimentos comúnmente utilizados en la alimentación de conejos, ha sido estandarizada y validada por diferentes laboratorios (Villamide et al. 2008 y Carabaño et al. 2008), demostrándose su fiabilidad, reproducibilidad y repetibilidad. Uno de los puntos críticos de las metodologías gravimétricas es la filtración con crisol, ya que las propiedades físicas junto con la composición química de diversas materias primas dificultan este proceso y aumentan la variabilidad en los resultados (Mertens, 2002). Por otra parte la digestión individual de las muestras limita la capacidad de análisis. Con la finalidad de corregir estas limitaciones se propuso como alternativa el uso de bolsas ANKOM®, ya utilizadas en el análisis secuencial de Van Soest (Kenneth et al., 1999), digeridas colectivamente en un mismo recipiente. Además de la utilización de bolsas, como novedad se incluyó al final de la digestibilidad un lavado adicional de las bolsas. El objetivo de este trabajo fue determinar la validez de esta modificación en la digestibilidad *in vitro* ileal (dos pasos) y fecal (tres pasos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 piensos de conejos (descritos en estas jornadas en Abad et al., 2011) y 6 materias primas (lignocelulosa, paja de cereal, cascarilla de girasol, pectinas de pulpa de remolacha, pulpa de remolacha –PR-, fibra insoluble de pulpa de remolacha), con un amplio rango de digestibilidad. Primero se identificó y pesó las bolsas ANKOM®, para lo cual previamente se las secó a 103°C en la estufa durante 12 h. Dentro de cada bolsa se pesó 0.5 g de muestra \pm 0.1 mg, se sellaron con calor y se las agitó para obtener una mejor dispersión de la muestra dentro de la bolsa. Éstas (hasta un máximo de 30) se situaron colectivamente dentro de una botella de vidrio (3.6 L., mantenida en rotación durante la digestibilidad en un sistema de incubación *in vitro* Daisy-II de ANKOM®). Tanto en el caso de utilizar crisoles como bolsas la digestión se realizó en dos y/o tres pasos. En el paso 1, las muestras fueron sumergidas en una solución tampón fosfato (0.1 M, pH 6, tampón A), 25 ml/muestra, más 10 ml HCl 0.2 M/muestra. Esta solución se ajustó a pH 2 con HCl o NaOH 1 M. Se añadió por muestra 1 ml pepsina diluida en HCl 0.2 M (25 mg/ml) y 0.5 ml de una solución de cloranfenicol (0.5 g/100ml etanol), y se incubó a 40°C durante 1.5 h en la estufa. En el paso 2, se añadió por muestra 10 ml de solución tampón fosfato (0.2 M, pH 6, tampón B) y 5 ml de NaOH 0.6 M, se ajustó el pH a 6.8 ± 0.01 con HCl o NaOH 1 M, se añadió por muestra 1 ml de una solución de pancreatina (100 mg Porcine, grade IV, P-1750/ml de tampón B) y se incubó a 40°C durante 3.5 h en la estufa. En el paso 3, se ajustó el pH a 4.8 con ácido acético y se añadió por muestra 0.5 ml de viscozyme (complejo enzimático microbiano), incubándose durante 16 h a 40°C en la estufa. Tras la digestión, los crisoles se lavaron como indica la técnica original, mientras que las bolsas se lavaron con tres soluciones (para evitar la adherencia de sustancias en el exterior de la bolsa): en primer lugar con agua destilada a 40 °C durante 30 minutos y en rotación dentro del sistema de incubación *in vitro* Daisy-II, con dos aclarados con agua a 40°C de 5 minutos, seguidamente

lavó consecutivamente con etanol al 96% y acetona (cada una durante 5 minutos). Las muestras se pre-secaron a temperatura ambiente y se introdujeron en la estufa a 103°C durante 16 horas. La digestibilidad de la materia seca in vitro (DMSiv) se calculó con la siguiente fórmula:

$$DMSiv = \frac{\text{Peso bolsa post digestión} - \text{peso de la bolsa vacía}}{\text{Peso muestra seca}} \times 100$$

Los valores obtenidos con bolsas se corrigieron con un blanco tal como describe al técnica ANKOM®. Para validar la modificación de la metodología junto a cada análisis con bolsas ANKOM®, se realizó la metodología descrita por Ramos et al. (1992) utilizando 0.5 g de muestra por muestra. Se hicieron DMSiv con dos (digestibilidad ileal) y tres pasos (digestibilidad fecal). Se realizaron las digestibilidades en 3 tiempos, con dos réplicas por alimento, método y tiempo, calculándose el valor medio de cada alimento por método y tiempo. Los resultados se analizaron de acuerdo con una estructura factorial: 2 métodos x 10 alimentos x 3 tiempos, para la digestibilidad de dos y tres pasos. Además se determinó la correlación existente entre ambos métodos.

Tabla 1. Determinación de la digestibilidad in vitro en conejos: Comparación del método convencional de filtrado en crisol con el uso de bolsas ANKOM® en digestiones colectivas (Bolsa C).

Muestras	FDT [‡]	% DMSiv ₁₂		% DMSiv ₁₂₃	
		Crisol	Bolsa C	Crisol	Bolsa C
<i>Piensos¹</i>					
A	35.1	63.8	64.1	66.8	67.8
B	39.7	64.7	63.9	68.5	69.9
C	40.4	60.7	58.4	71.6	70.6
D	36.2	63.0	64.3	73.2	73.4
<i>Materias primas</i>					
Lignocelulosa ²	95.9	2.41	1.56	5.56	3.95
Pectinas remolacha ³	93.4	98.9	98.5	99.2	99.9
Pulpa remolacha, PR	64.6	33.6	33.8	81.5 ^a	79.1 ^b
Fibra insoluble PR	80.5	13.0	15.2	67.2	67.1
Cascarilla de girasol	84.1	13.5	11.3	23.2 ^a	20.6 ^b
Paja de cereal	78.5	17.4	17.2	21.5 ^a	19.5 ^b
Media método		43.1	42.8	57.8	57.2
rsd			1.40		0.92
P _{método}			0.44		0.009
P _{alimento}			< 0.001		< 0.001
P _{alimento x método}			0.16		0.002

¹ DMSiv₁₂: Digestibilidad de la materia seca in vitro 2 pasos. DMSiv₁₂₃: Digestibilidad de la materia seca in vitro 3 pasos. [‡] Fibra dietética total (AOAC, 985.29). ¹ Los ingredientes de los piensos se muestran en la comunicación de estas jornadas Abad et al. (2011). ² Arbocel®. ³ Betapec RU 301. Para cada combinación de método (bolsa colectiva vs. crisol) y DMSiv (dos o tres pasos) cuando la interacción fue significativa se han colocado para cada alimento en el que los valores de los métodos difirieron con P < 0.05 superíndices distintos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En comparación con los valores de DMSiv obtenidos con crisoles, aquéllos obtenidos con bolsas digeridas colectivamente no fueron distintos para el conjunto de los alimentos al hacer la digestibilidad en dos pasos (43.1 vs. 42.8%, respectivamente. P = 0.44. Tabla 1),

sin detectarse efecto de la interacción alimento x método. Sin embargo, en el caso de la DMSiv en tres pasos se observó un ligero descenso en la digestibilidad determinada con bolsas en colectivo con respecto a los crisoles (- 0.6 unidades porcentuales. $P = 0.009$). Esta pequeña diferencia probablemente se debió a la reducida variabilidad de estas determinaciones, como ya han observado con anterioridad Carabaño et al. (2008). Además, se observó una interacción alimento x método ($P = 0.002$) debido a que la digestión colectiva en bolsas mostró menores valores para la pulpa de remolacha, cascarilla de girasol y paja, sin afectar al resto de materias primas ni a los piensos. En todo caso, estas diferencias fueron pequeñas, estando entre 2.0 y 2.6 unidades porcentuales. Al estudiar la correlación entre el crisol respecto a las bolsas colectivas tanto en la digestibilidad de 2 y 3 pasos se obtuvieron correlaciones muy elevadas ($r \geq 0.98$. $P < 0.001$). Los resultados obtenidos indican que las bolsas ANKOM[®] pueden ser utilizadas como método alternativo al crisol en la DMSiv de 2 y 3 pasos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Carabaño R., Nicodemus N., Garcia J., Xiccato G., Trocino A., Pascual J.J., Falcao-e-Cunha L., Maertens L. 2008. *World Rabbit Sci.* 16: 195-203 • Ramos M., Carabaño R., Boisen S., 1992. *J. Appl. Rabbit Res.* 15, 938-946. • Mertens D.R. (2002) *J. AOAC Int.* 85: 1217-1240. • Kenneth V., Jeffrey P., Steven M. and John T. 1999. *Crop. Sci.* 39:276-279. • Villamide M.J., Carabaño R., Maertens L., Pascual J., Guidene T., Falcao-E-Cunba L., Xiccato G. (2009). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 153:283-294.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL2008-00627 y una beca del SENESCYT-Ecuador. Los autores de este trabajo agradecen su colaboración a Andrés Caidas.

USE OF ANKOM[®] BAGS FOR IN VITRO DRY MATTER DIGESTIBILITY IN RABBITS

Abstract: The aim of this work was to compare the use of ANKOM[®] bags vs. crucibles to determine in vitro dry matter digestibility (ivDMD, performed in two or three steps corresponding to ileal and faecal digestibility, respectively) of four rabbit diets and six raw materials with a wide range of DM digestibility (from beet pectins to lignocellulose). Crucibles were compared to bags placed collectively (up to 30 in a 3.6 L Daisy jar in a rotating in vitro incubator system Daisy-II). Once digested, samples placed collectively were washed with water (40°C, 30 min, rotating in Daisy system, and additionally rinsed two times 5 min. in water), ethanol and 96% acetone (each one for 5 min.). Bag samples were corrected with blanks. Each analysis was done at three different times being replicated twice each time and using the average of each time and feed for statistical analysis. Values obtained for ivDMD in two steps were similar using crucibles or bags for the whole feeds ($P = 0.44$, 43.1 vs. 42.8%, respectively), with no interaction feed x method. However, ivDMD in three steps decreased in collective bags compared to crucibles (- 0.6 percentage units. $P = 0.009$). This narrow difference is probably detected due to the reduced variability observed in this determination. Besides, an interaction feed x method was found for three steps ivDMD ($P = 0.002$), as digestion in collective bags was lower than that of crucibles for sugar beet pulp, sunflower hulls and straw, with no effect on the other feeds and in none diet. In general, these differences were small, ranging between 2.0 to 2.6 percentage units. Correlation between two and three step ivDMD with crucibles and bags was very high ($r \geq 0.98$. $P < 0.001$). These results suggest that ANKOM[®] bags can be used as an alternative to crucibles in ivDMD.