



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE
CIENCIA ANIMAL

**IMPLEMENTACIÓN Y MODIFICACIONES
DEL MÉTODO PARA DETERMINAR
LA FIBRA SOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO**

TESIS DE MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

CRISTINA NAVARRETE BAUTISTA

Director: Enrique Blas

Valencia, diciembre 2008

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA PARED CELULAR VEGETAL	1
1.2. PRINCIPALES CONSTITUYENTES PARIETALES	4
1.3. ANÁLISIS DE LA FIBRA	8
1.3.1. FIBRA BRUTA	8
1.3.2. FIBRAS VAN SOEST	9
1.3.3. FIBRA DIETARIA	10
1.3.4. FIBRA SOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO	11
1.3.5. ESQUEMA-RESUMEN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR LA FIBRA	12
1.4. ANÁLISIS DE LA FIBRA SOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO	13
1.4.1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RESIDUO INSOLUBLE EN ETANOL (RIE)	13
1.4.2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LA FIBRA NEUTRO DETERGENTE (FND)	13
1.4.3. MÉTODOS GENERALES	14
1.4.4. CÁLCULOS	14
2. OBJETIVOS	15
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	16

3.1. EXPERIMENTO 1	16
3.2. EXPERIMENTO 2	20
3.3. EXPERIMENTO 3	24
3.4. EXPERIMENTO 4	25
3.5. EXPERIMENTO 5	26
4. CONCLUSIONES	30
5. BIBLIOGRAFÍA	31
6. ANEXO	33

ÍNDICE FIGURAS

• Figura 1: Esquema en perspectiva de una pared celular vegetal.	2
• Figura 2: Esquema en perspectiva de la pared celular primaria.	3
• Figura 3: Esquema de la pared de una célula vegetal y sus constituyentes fibrosos.	4
• Figura 4: Clasificación simplificada de la fibra dietaria.	5
• Figura 5: Métodos analíticos para determinar la fibra dietaria.	12
• Figura 6: Esquema del Experimento 1.	17
• Figura 7: Esquema del Experimento 2.	21
• Figura 8: Esquema del Experimento 5.	26

ÍNDICE TABLAS

• Tabla 1: Resultados del Experimento 1 (% de la MS).	18
• Tabla 2: Efecto del tipo de extracción, la materia prima y su interacción sobre la determinación de FND y PBFND (% de la MS).	19
• Tabla 3: Resultados del Experimento 2 (% de la MS).	22
• Tabla 4: Efecto del tipo de extracción sobre la determinación de FND y PBFND (% de la MS).	23
• Tabla 5: Contenido en EERIE (% de la MS).	24
• Tabla 6: Resultados del Experimento 4.	25
• Tabla 7: Resultados del Experimento 5 (% de la MS).	27
• Tabla 8: Contenido en FSDN de los piensos estudiados en dos periodos de análisis (% de la MS).	28
• Tabla 9: Composición en ingredientes de los piensos utilizados (% de la MS).	29

ABREVIATURAS

- **MS:** Materia seca.
- **MO:** Materia orgánica.
- **PB:** Proteína bruta.
- **EE:** Extracto etéreo.
- **FB:** Fibra bruta.
- **ELN:** Extractivos libres de nitrógeno.
- **FND:** Fibra neutro-detergente.
- **FAD:** Fibra ácido-detergente.
- **LAD:** Lignina ácido-detergente.
- **FDT:** Fibra dietaria total.
- **FDI:** Fibra dietaria insoluble.
- **FDS:** Fibra dietaria soluble.
- **FSDN:** Fibra soluble en detergente neutro.
- **RIE:** Residuo insoluble en etanol.
- **MO_{RIE}:** Materia orgánica en el residuo insoluble en etanol.
- **AL_{RIE}:** Almidón en el residuo insoluble en etanol.
- **PB_{RIE}:** Proteína bruta en el residuo insoluble en etanol.
- **EE_{RIE}:** Extracto etéreo en el residuo insoluble en etanol

- **FND_{RIE}**: Fibra neutro-detergente en el residuo insoluble en etanol.
- **PB_{FND}**: Proteína bruta en la fibra neutro detergente.
- **PB_{FNDRIE}**: Proteína bruta en la fibra neutro-detergente del residuo insoluble en etanol.

1. INTRODUCCIÓN

El principal problema para el estudio de la fibra en alimentación animal (y humana) es el de definir esta fracción correctamente. Inicialmente puede definirse como la fracción de las células vegetales resistente a los enzimas digestivos segregados por los animales. Estaría compuesta, fundamentalmente, por polímeros vegetales no hidrolizables por los enzimas endógenos pero sí por los aportados por los microbiota digestiva residente principalmente en el rumen y en el intestino posterior (ciego y colon). La actividad de estos enzimas microbianos permite la hidrólisis en compuestos simples cuya fermentación da lugar a la formación de ácidos grasos volátiles (absorbidos por el animal) y gases (CO_2 , CH_4).

Desde un punto de vista más cercano a la morfología botánica, algunos autores proponen definirla como el conjunto compuesto por los polisacáridos y la lignina constituyentes de la pared celular vegetal.

A pesar del esfuerzo de los últimos 35 años, todavía no hay un acuerdo “universal” sobre la definición de fibra dietaria. Esta falta de uniformidad a la hora de definir la fibra debe atribuirse probablemente a la compleja estructura de la pared celular vegetal y a la dificultad de aislar sus diferentes componentes. Además, algunos de estos constituyentes parietales están ligados a otras fracciones celulares, como proteínas. Por último, la estructura química y la organización de los polisacáridos parietales difieren ampliamente según el tipo de planta.

1.1. LA PARED CELULAR VEGETAL

El espesor, la organización y la composición de las paredes celulares vegetales pueden variar ampliamente. Aunque no existe un modelo totalmente aceptado para explicar la estructura tridimensional de las paredes celulares, desde un punto de vista botánico, en la pared celular vegetal se pueden distinguir, en general, tres estratos: lámina media, pared celular primaria y pared celular secundaria (Figura 1).

Figura 1.- Esquema en perspectiva de una pared celular vegetal

(Fuente: García Breijo, 2008)

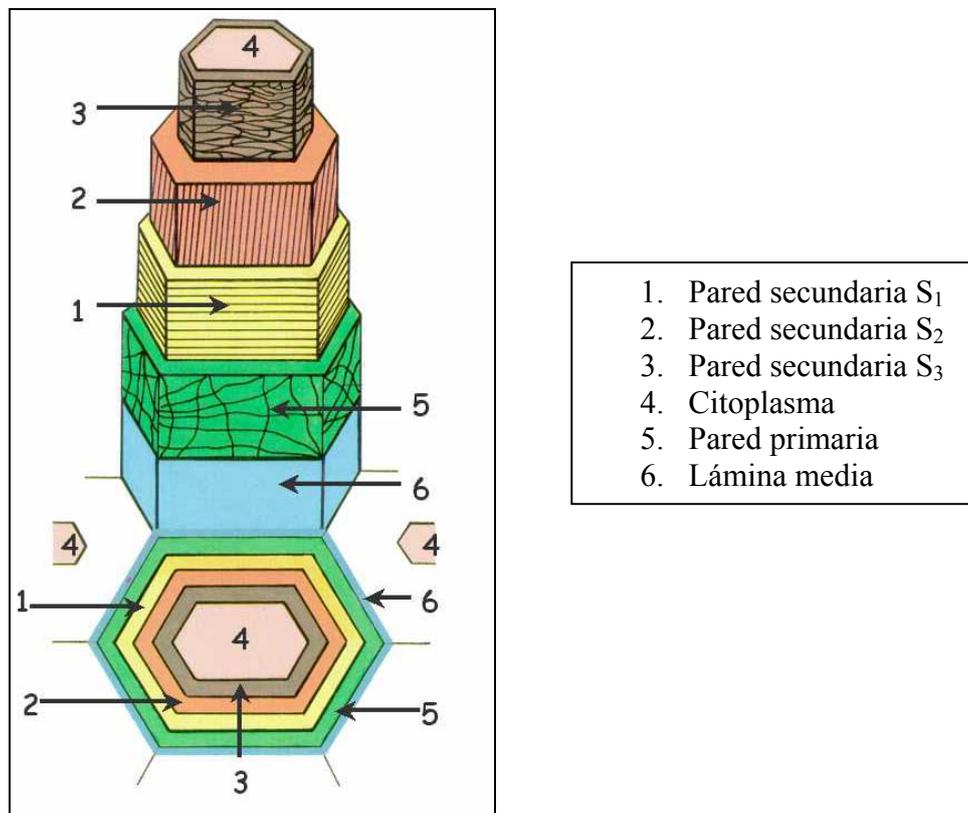


Lámina media:

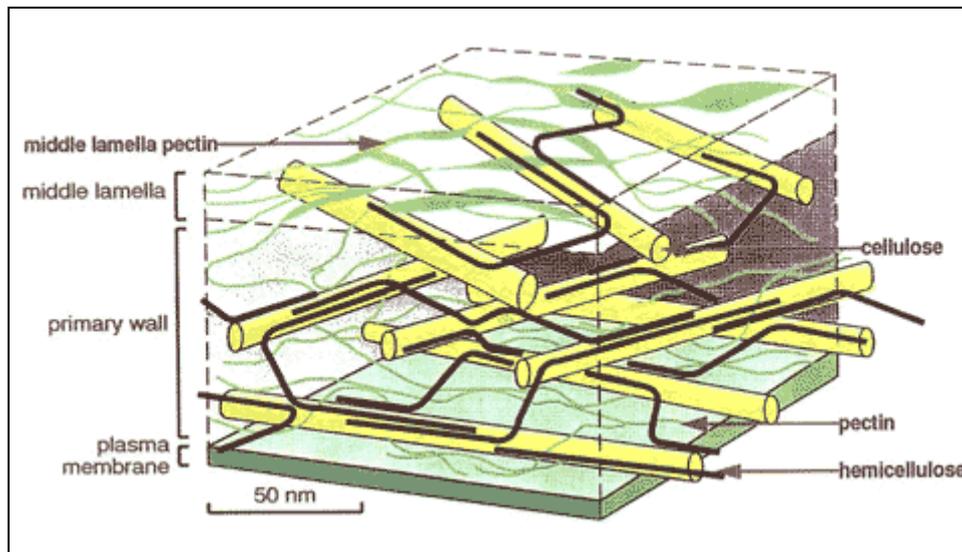
Se trata de la sustancia intercelular amorfa, cementante, que se encuentra entre dos células contiguas, que la comparten. Es la capa que se forma primero, en el momento de la división celular y se compone principalmente de pectinas.

Pared celular primaria:

Es la capa más externa de la célula. Se forma inmediatamente después de la división celular y se va adaptando a la célula conforme va creciendo. Es más gruesa que la lámina media pero más delgada y flexible que la pared celular secundaria. Se compone de microfibrillas de celulosa asociadas a hemicelulosas (arabinoxilanos en plantas monocotiledóneas, xiloglucanos en plantas dicotiledóneas.) y pectinas (más abundantes en las dicotiledóneas), que conforman un entramado altamente resistente (Figura 2). En algunos casos permanece sin modificarse o con ligeros cambios, sin la aparición de la pared celular secundaria cuando el proceso de crecimiento de la célula ha finalizado; en las células que únicamente desarrollan esta pared no hay lignificación

alguna. Si se desarrolla pared celular secundaria, su lignificación puede extenderse a la pared celular primaria cuando la planta envejece. También contiene una cierta cantidad de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y otras proteínas.

Figura 2.- Esquema en perspectiva de la pared celular primaria
(Fuente: Darling, 2008)



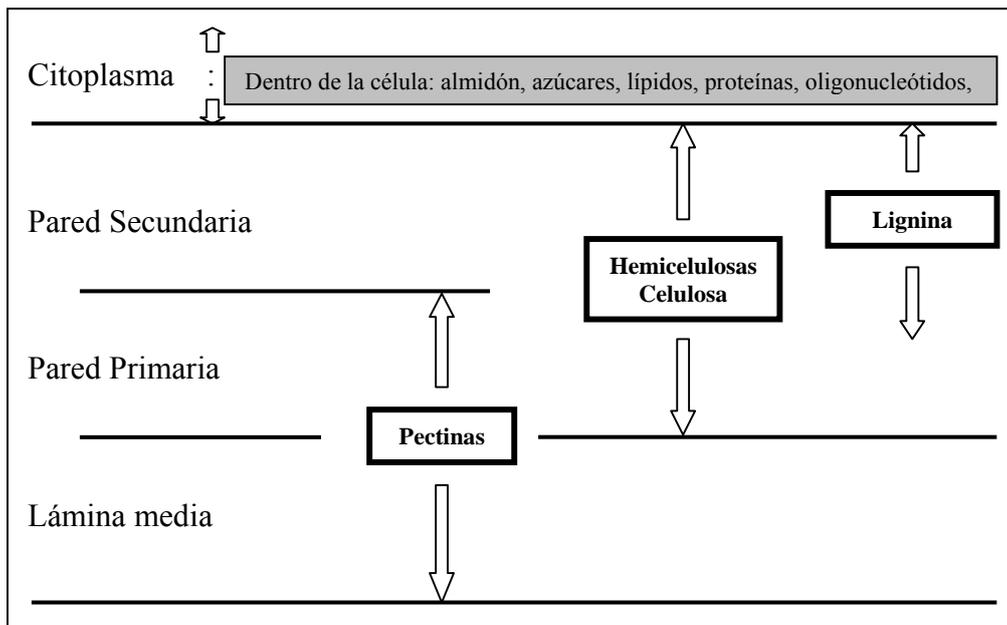
Pared celular secundaria:

Está presente sólo en algunos tipos celulares y se desarrolla interiormente a partir de la pared celular primaria, una vez finalizada la expansión celular, alcanzando mayor espesor. Se diferencian tres láminas (S_1 , S_2 y S_3), según la diferente orientación de las microfibrillas de celulosa y, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, la celulosa se encuentra asociada a hemicelulosas (xilanos, glucuronoarabinosilanos). Algunas veces su composición es parecida a la de la pared celular primaria (aunque sin pectinas) pero habitualmente contiene lignina (polímeros de derivados alcohólicos del fenilpropano), que proporciona soporte estructural y rigidez a las plantas de porte elevado, siendo además una eficaz barrera física que protege a las plantas del ataque por hongos o bacterias. Otros compuestos que puede encontrarse a veces en esta capa son cutina y suberina.

En definitiva, básicamente, la pared celular vegetal está compuesta por microfibrillas de celulosa conformando un fuerte armazón que da rigidez a la planta, incrustadas en una matriz compuesta que contiene otros polisacáridos como

hemicelulosas (arabinoxilanos, xiloglucanos, etc) y pectinas, lignina y algunas glicoproteínas (Carpita, 1996). Como puede verse en la Figura 3, estos polímeros están en diferentes proporciones dependiendo del estrato de la pared celular considerado.

Figura 3.- Esquema de la pared de una célula vegetal y sus constituyentes fibrosos
(Fuente: adaptado de Gidenne 2003)



1.2. PRINCIPALES CONSTITUYENTES PARIETALES

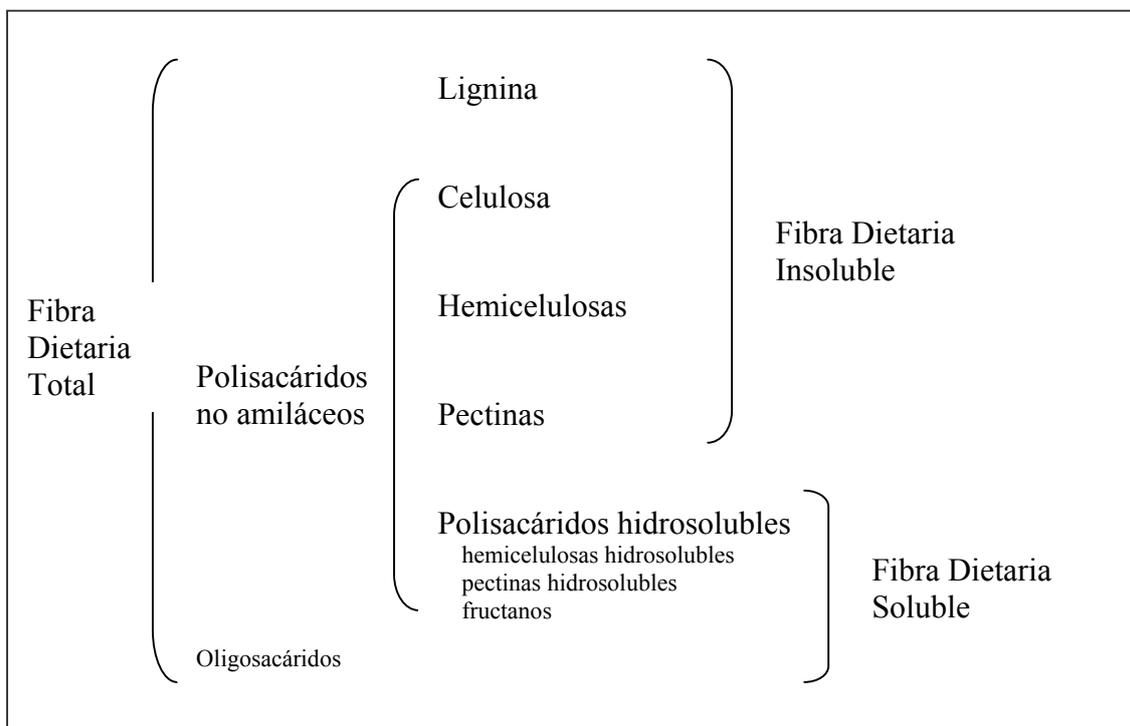
Entre los numerosos constituyentes de la pared celular vegetal, conviene destacar cinco clases principales de compuestos fibrosos, en función de su estructura química y sus propiedades:

- cuatro clases de polímeros insolubles en agua (lignina, celulosa, hemicelulosas insolubles, pectinas insolubles)
- una clase de compuestos solubles en agua (hemicelulosas solubles, pectinas solubles; también se incluyen algunos carbohidratos no parietales que sólo son degradables por enzimas microbianos, como ciertos polisacáridos de bajo peso molecular y oligosacáridos).

Esta clasificación de la fibra dietaria se ilustra en la Figura 4. A continuación se detallan los aspectos más relevantes de cada una de las distintas clases de fibra.

Figura 4.- Clasificación simplificada de la fibra dietaria

(Fuente: adaptado de Li 1995)



Lignina

Se trata de los únicos polímeros no sacáridos de la pared celular (desde un punto de vista estrictamente bioquímico debería utilizarse el término en plural, aunque todos tienen similares propiedades y la misma significación digestiva o nutricional). Forman una red tridimensional muy ramificada y completa, constituida por tres derivados alcohólicos del fenilpropano (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico). Las redes de lignina tienden a fijar a los otros polímeros parietales, excluyen al agua y hacen que la pared celular sea más rígida y resistente. Es resistente a la mayoría de agentes químicos y enzimáticos, incluyendo los enzimas microbianos. Existen fuertes enlaces químicos entre la lignina y la mayoría de los polisacáridos (y proteínas) parietales, lo que impide o dificulta la digestión de estos compuestos.

La mayor parte de los alimentos concentrados y de las plantas herbáceas jóvenes contienen menos del 5% de lignina; cuando la hierba envejece, su contenido en lignina alcanza el 12%.

Celulosa

Es el principal polisacárido estructural de la pared celular. Es un homopolímero formado por cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$, con un grado de polimerización normalmente en torno a 8000-10000. Estas cadenas lineales se agregan entre sí mediante puentes de hidrógeno formando microfibrillas. Se encuentra unida física y químicamente a otros componentes parietales como las hemicelulosas y la lignina. Sólo es soluble (y parcialmente hidrolizable) en soluciones ácidas fuertes (por ejemplo, ácido sulfúrico 12M). Su degradabilidad por la microbiota digestiva (fermentescibilidad) puede considerarse lenta/baja.

Cuantitativamente, la celulosa representa el 40-50% de la materia seca (MS) en las cascarillas de legumbres y semillas oleaginosas, el 10-30% en forrajes y pulpas de remolacha y el 3-15% en legumbres y semillas oleaginosas. La mayoría de los cereales contienen pequeñas cantidades de celulosa (1-5%) excepto la avena (10%).

Hemicelulosas

Las hemicelulosas son un grupo de diversos polisacáridos con menor grado de polimerización que la celulosa. Generalmente, se trata de heteropolímeros ramificados con un esqueleto constituido por xilosa, glucosa, manosa o galactosa, con enlaces $\beta(1-4)$, con cadenas laterales formadas por arabinosa, ácido galacturónico, galactosa, glucosa o xilosa; no obstante, como se verá más adelante, también se incluyen algunos homopolímeros lineales. La principal hemicelulosa de la pared celular primaria en dicotiledóneas (tanto en plantas como en semillas) son xiloglucanos, mientras que los cereales contienen arabinoxilanos y β -glucanos (homopolímeros lineales de glucosa con enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$), siendo ambos parcialmente solubles en agua. También se incluyen otros heteropolímeros ramificados (enlaces $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-3)$), como arabinogalactanos (en semillas de soja), galactomananos (en legumbres), glucomananos y galactoglucomananos. Asimismo, también se clasifican como hemicelulosas polímeros lineales de xilosa con enlaces $\beta(1-4)$ (xilanos) o de manosa (mananos). Las hexosanas, tales como mananos, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos sólo son solubles en soluciones alcalinas fuertes; las pentosanas, tales como xilanos y arabinoxilanos, son solubles en soluciones alcalinas débiles o en

soluciones ácidas calientes y algunas en detergente neutro e incluso en agua caliente, como ya se ha indicado. Con la limitación que supone la heterogeneidad de este grupo de polímeros, las hemicelulosas son en general de fermentescibilidad intermedia.

Las hemicelulosas constituyen en torno al 10-25% de la MS en forrajes, subproductos industriales (salvados, cascarillas, pulpas), legumbres y semillas oleaginosas, y sobre un 2-12% de MS en cereales y raíces.

Pectinas

Son un grupo de varios heteropolisacáridos ramificados compuestos por un esqueleto lineal de ácido galacturónico (interrumpido con unidades de L-ramnosa) y ramificaciones que contienen azúcares neutros (principalmente arabinosa y galactosa); las sustancias pécticas incluyen pectinas y polisacáridos neutros (arabinanos, galactanos, arabinogalactanos). Son solubles en detergentes (neutro o ácido) y algunas en agua caliente. Son altamente fermentescibles, como el almidón.

Las pectinas representan alrededor del 25% de la MS en las pulpas de remolacha o cítricos, del 5-10% en las leguminosas herbáceas (como la alfalfa) y del 4-14% en las legumbres.

Carbohidratos fibrosos no parietales

También son constituyentes de la fibra dietaria ciertos compuestos no parietales, solubles en agua fría pero no en etanol-agua y que son de alta fermentescibilidad. Los fructanos son polisacáridos de reserva de bajo peso molecular, solubles en agua y constituidos esencialmente por fructosa, aunque la mayoría presenta unidades terminales de sacarosa; se distinguen tres grupos: levano, inulina y fructanos altamente ramificados. También se incluyen oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 15.

En general son poco abundantes en los alimentos para animales, siendo destacable el contenido en fructanos de raíces y hierbas gramíneas (5-15% de la MS), así como el de α -galactósidos de las legumbres (5-8% de la MS).

1.3. ANÁLISIS DE LA FIBRA

Dada la heterogeneidad de sus componentes, el análisis de la fracción fibrosa de los alimentos es inevitablemente problemático. De hecho, ninguno de los métodos analíticos desarrollados (o sus combinaciones) puede considerarse bioquímicamente preciso y permite una valoración cuantitativa completa de los distintos constituyentes de la fibra dietaria. A continuación se describen los fundamentos y las limitaciones de los métodos analíticos más extendidos para determinar la fibra.

1.3.1. FIBRA BRUTA

El *análisis inmediato de los alimentos o método Weende*, establecido por Henneberg y Stohmann en 1859, distingue seis fracciones: humedad, cenizas, proteína bruta (PB), extracto etéreo (EE), fibra bruta (FB) y extractivos libres de nitrógeno (ELN). El análisis de FB es, por tanto, el más antiguo y se concibió como una estimación de la fracción indigestible del alimento: se cuantifica la materia orgánica (MO) del residuo alimentario procedente de la extracción con éter y resistente a los ataques sucesivos con ácido diluido (H_2SO_4 al 1.25%) y con álcali diluido (NaOH al 1.25%).

La principal limitación de este método estriba en que el grado de solubilización de los distintos componentes parietales varía dependiendo del alimento analizado, por lo que la fibra bruta contiene proporciones variables de distintas clases de fibra: 15-90% de la lignina, 30-100% de la celulosa, 15-20% de las pentosanas, etc.. En otras palabras, esta fracción incluye lignina, celulosa y hemicelulosas, pero no necesariamente las cantidades totales de dichas sustancias (una cantidad variable de las mismas, que depende de la planta y de su fase de crecimiento, queda recogida en la fracción ELN).

A pesar de su notable imprecisión como estimador de la fibra dietaria, este criterio para valorar la fibra fue muy utilizado hasta hace dos décadas e incluso ahora se sigue utilizando todavía, por su rapidez, sencillez, bajo coste y aceptable correlación con el valor nutritivo de los alimentos.

1.3.2. FIBRAS VAN SOEST

Debido a las inexactitudes comentadas, se han desarrollado otros métodos que nos aportan un análisis bioquímico más preciso y que nos permiten evaluar y predecir el significado nutricional de los alimentos. A partir de 1963, Van Soest y colaboradores han desarrollado un método secuencial que se basa en el empleo de detergentes y pretende fraccionar los constituyentes parietales. Inicialmente, el método se desarrolló para forrajes y ha sido modificado por distintos autores para adaptarlo a concentrados, básicamente incluyendo un pretratamiento de la muestra con amilasa termoestable en ebullición.

Este método implica la determinación de tres fracciones: fibra neutro-detergente (FND), fibra ácido-detergente (FAD) y lignina ácido-detergente (LAD). La FND es la MO del residuo alimentario que queda tras la extracción por ebullición con solución neutra de sulfato lauril sódico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); se compone principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosas. La FAD es la MO del residuo que queda tras una segunda extracción por ebullición con solución ácida de bromuro de cetiltrimetilamonio; está constituida esencialmente por lignina y celulosa. La LAD es la MO que resiste un tercer ataque con H_2SO_4 concentrado al 72%; contiene básicamente lignina. La principal ventaja del método es que, en principio, permiten fraccionar la pared celular en sus componentes principales, ya que permite estimar la lignina (LAD), la celulosa (FAD-LAD) y las hemicelulosas (FND-FAD).

No obstante, este método también tiene sus limitaciones. Dependiendo del alimento, este análisis no separa con la precisión deseable todas las fracciones de la pared celular, ya que las pectinas y algunas hemicelulosas son solubilizadas por el detergente neutro y por tanto no se cuantifican, mientras que en la fracción FAD pueden quedar otras hemicelulosas. Además, la fracción FND tiene un contenido proteico muy variable (1-20%) y también puede contener cantidades residuales de almidón y pectinas.

Actualmente este método es muy ampliamente utilizado en el análisis de alimentos para animales.

1.3.3. FIBRA DIETARIA

En nutrición humana se suele emplear la expresión fibra dietaria, que incluye la lignina y todos los carbohidratos (insolubles o solubles) no digeridos por enzimas endógenos. Se distinguen dos tipos de métodos para determinarla, enzimático-gravimétricos y enzimático-cromatográficos. Hasta ahora se trata de métodos utilizados en alimentos para humanos, que no han sido validados en alimentos para animales.

Métodos enzimático-gravimétricos

El método se desarrolló para fibra dietaria total (FDT) y después se extendió a la determinación de la fibra dietaria insoluble (FDI) y la fibra dietaria soluble (FDS). Las muestras se gelatinizan por calentamiento en presencia de amilasa termoestable y se incuban con enzimas (sucesivamente, proteasa y amiloglucosidasa) para eliminar las proteínas y el almidón; la FDT se precipita con etanol, se lava, se seca, se pesa y se corrige por proteína no digerida y cenizas. Si tras la incubación con enzimas se procede a filtrar, el residuo se utiliza para determinar la FDI y el filtrado se precipita con etanol para determinar la FDS. El método de Carré y Brillouet (1989) determina la pared celular insoluble y es muy similar a la FDI, aunque sin corrección por proteína.

Métodos enzimático-cromatográficos

Con estos métodos (método Uppsala, método de Englyst) se identifican los distintos componentes (azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina) de la FDT, FDI y FDS. En primer lugar se elimina el almidón enzimáticamente. Tras precipitación con etanol, el residuo de polisacáridos no amiláceos se hidroliza con ácido sulfúrico 12M. Cada uno de los azúcares neutros monoméricos liberados se cuantifica mediante cromatografía gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución; los ácidos urónicos del hidrolizado se cuantifican colorimétricamente; la lignina se determina gravimétricamente. Hidrolizando el residuo de polisacárido no amiláceos de otra muestra filtrada antes de precipitarla con etanol se determinan los componentes de la FDI, calculándose los componentes de la FDS por diferencia. Los principales componentes de los polisacáridos no amiláceos son ramnosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. La celulosa es la fuente principal de

glucosa, las hemicelulosas proporcionan fundamentalmente xilosa, manosa y galactosa, y la hidrólisis de las pectinas libera sobre todo ácidos urónicos, arabinosa y galactosa.

1.3.4. FIBRA SOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO

Por lo ya indicado, se puede deducir que los criterios FB, FND, FAD, LAD, FDT y FDI no permiten valorar la fracción fibrosa más rápida e intensamente degradable por la microbiota digestiva, que estaría integrada principalmente por pectinas (insolubles y solubles), hemicelulosas solubles (arabinoxilanos y β -glucanos), fructanos y oligosacáridos.

En teoría, sería posible estimar esta fracción fibrosa por diferencia entre FDT y FND. Sin embargo, cuando se utiliza para piensos, esta diferencia es difícil de interpretar ya que a menudo es negativa (Gidenne, 2003).

La determinación de la FDS, según los métodos descritos en el apartado anterior, es una eficaz estimación de esta fracción fibrosa pero implica ciertas imprecisiones, derivadas sobre todo de una extracción incompleta (pectinas insolubles) o/y de que los polisacáridos solubilizados no precipiten completamente con etanol dependiendo de sus concentraciones en el extracto y de su grado de polimerización o ramificación; por otro lado, algunos de los métodos requieren equipos sofisticados y caros.

La determinación de la fibra soluble en detergente neutro (FSDN) (Hall *et al.*, 1997, 1998, 1999) es un método dirigido a solventar los problemas señalados y se basa en cambios de masa entre residuos extraídos. Su fundamento se describe a continuación.

En la preparación de muestras para análisis de polisacáridos es frecuente utilizar soluciones acuosas de etanol para extraer los azúcares simples, los oligosacáridos y otras sustancias de bajo peso molecular. La concentración del etanol determina en gran parte el tamaño de los oligosacáridos (o polisacáridos de bajo peso molecular) extraídos, de forma que con concentraciones más bajas del etanol se extraen carbohidratos más grandes. A efectos de valorar la fracción fibrosa más rápida e intensamente degradable, es recomendable utilizar 90:10 etanol/agua para la menor extracción de fructanos. De

este modo, los carbohidratos contenidos en la MO del residuo insoluble en etanol son almidón, fibra “soluble” y fibra “insoluble”.

La solución neutro detergente, incluyendo amilasa termoestable, extrae los carbohidratos de bajo peso molecular así como el almidón y la FSDN, dejando un residuo cuya MO constituye la FND.

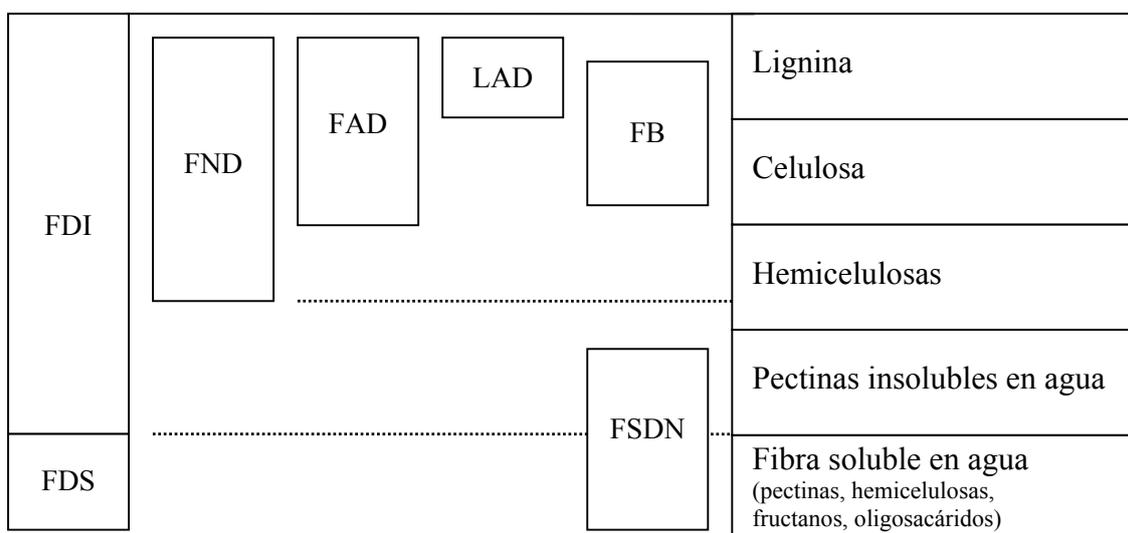
La diferencia entre la MO del residuo insoluble en etanol y la FND, corregida por almidón y proteína, es por tanto una buena estimación de la FSDN e incluye fundamentalmente pectinas (insolubles y solubles), hemicelulosas solubles (arabinosilanos y β -glucanos), fructanos y oligosacáridos.

1.3.5. ESQUEMA-RESUMEN DE LOS MÉTODOS ANÁLITICOS PARA DETERMINAR LA FIBRA

La Figura 5 ilustra la comparación de los distintos métodos descritos en los anteriores apartados.

Figura 5.- Métodos analíticos para determinar la fibra dietaria

(Fuente: adaptado de Gidenne 2003)



FDI: fibra dietaria insoluble; FDS: fibra dietaria soluble

FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente;

FB: fibra bruta; FSDN: fibra soluble en detergente neutro

1.4. ANÁLISIS DE LA FIBRA SOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO

En el presente apartado se describe el método para determinar la FSDN propuesto por Hall *et al.* (1997, 1998, 1999).

1.4.1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RESIDUO INSOLUBLE EN ETANOL (RIE)

Los RIEs se preparan con 0.5 g de muestra en 100 ml de solución etanol/agua (90:10), en agitación constante sobre placa magnética durante 4 horas, a temperatura ambiente.

Los destinados al análisis de MO en el RIE (MO_{RIE}) se filtran bajo vacío sobre crisol de placa porosa. Los destinados al análisis de almidón y PB en el RIE (AL_{RIE} y PB_{RIE} , respectivamente) se filtran bajo vacío sobre papel de filtro Whatman 54. Todos los RIEs se lavan dos veces con solución etanol/agua y otras dos veces con acetona, exceptuando los dirigidos a analizar PB_{RIE} , ya que la acetona podría interferir en los resultados. Los RIEs se secan en estufa a 55 °C durante una noche y se dejan equilibrar a la humedad ambiental.

1.4.2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LA FIBRA NEUTRO DETERGENTE (FND)

Las muestras de 0.5 se someten a una solución neutro detergente con amilasa termoestable, en ebullición con reflujo durante 1 hora (Van Soest *et al.*, 1991).

Como en el caso de los RIEs, los residuos destinados a determinar su contenido en MO (FND) se filtran bajo vacío sobre crisol de placa porosa y los residuos destinados al análisis de su contenido en PB (PB_{FND}) se filtran bajo vacío sobre papel de filtro Whatman 54. Todos los residuos se lavan dos veces con agua caliente y los dirigidos a analizar FND otras dos con acetona. Los residuos se secan en estufa a 55 °C durante una noche y se dejan equilibrar a la humedad ambiental.

1.4.3. MÉTODOS GENERALES

La MS y la MO se determinan por diferencia de peso antes y después de desecación en estufa a 105 °C durante 24 horas o incineración en mufla a 512 °C durante 8 horas, respectivamente.

Para el análisis del almidón, la gelatinización se provoca con dimetilsulfóxido a 95 °C durante 1 h, la hidrólisis enzimática se realiza según Holm *et al.* (1986) y la valoración de la glucosa resultante por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

La PB se determina como N Kjeldahl x 6.25.

1.4.4 CÁLCULOS

La FSDN se define como la MO del RIE que es soluble en detergente neutro y que no es almidón ni PB. Se calcula, por tanto, como:

$$\mathbf{FSDN = MO_{RIE} - FND - AL_{RIE} - PB_{RIE} + PB_{FND}}$$

donde todos los términos se expresan como % de la MS de la muestra valorada (sin extraer).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es **implementar el análisis de la fibra soluble en detergente neutro (FSDN) en el Laboratorio del Departamento de Ciencia Animal de la UPV** incorporando distintas modificaciones del método originalmente propuesto (Hall et *al.*, 1997, 1998, 1999), para adaptarlo y mejorar su rendimiento y precisión.

La principal objeción que se hace al análisis de la FSDN es que se trata de un procedimiento demasiado complejo para ser utilizado de forma rutinaria en materias primas y piensos para animales. Esta dificultad estriba, en buena medida, en los procesos de extracción individualizada de cada muestra en vasos de precipitado seguidos de filtración y recuperación de los residuos sobre crisoles de placa porosa o sobre papel de filtro. La adaptación del método al empleo de bolsas de extracción (sistema ANKOM) permitiría simplificar notablemente el procesado de las muestras y aumentar el número de muestras procesadas por unidad de tiempo; asimismo, cabe esperar mayor precisión analítica ya que se evitarían pérdidas de muestra asociadas al proceso de extracción-filtración-recuperación del residuo.

Además, el método original presenta algunos aspectos que merecen ser estudiados de forma específica. Mientras que almidón y PB se determinan sobre el residuo insoluble en etanol, la FND se determina directamente sobre muestra no extraída con etanol, asumiendo que todos los constituyentes solubles en etanol también lo son en el detergente neutro (o, en otras palabras, que la fracción insoluble en el detergente neutro también es íntegramente insoluble en etanol); aunque tal asunción es razonable, el análisis de la FSDN se fundamenta en cambios de masa en residuos extraídos y parece lógico comprobar si es más apropiado que el procedimiento sea secuencial, de forma que la extracción con detergente neutro se realice sobre el residuo insoluble en etanol. Por otro lado, se señala que la extracción con etanol es eficaz para solubilizar el extracto etéreo de materias primas y piensos de escaso contenido en grasa pero podría ser insuficiente en el caso de materiales con mayor contenido en grasa, lo que aconseja testar la necesidad de realizar la determinación del extracto etéreo del residuo insoluble en etanol o una extracción previa con éter.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La primera modificación con respecto al protocolo original fue adaptarlo a la rutina del laboratorio, utilizando bolsas ANKOM F57 para extraer las muestras con etanol o detergente neutro, en lugar de hacerlo con las partículas de la muestra en libre movimiento dentro de la solución extractora y posterior filtración sobre crisoles de placa porosa o papel de filtro. Como ya se ha señalado, con ello se simplifica notablemente el procesado de las muestras y se aumenta el número de muestras procesadas por unidad de tiempo; asimismo, cabe esperar mayor precisión analítica ya que se evitan pérdidas de muestra asociadas al proceso de extracción-filtración-recuperación del residuo.

En los primeros experimentos, la extracción con etanol se llevó a cabo en un vaso de precipitado donde se introducían las bolsas con muestra; pero mantenerlas en agitación constante durante 4 horas para que la penetración del etanol se produzca de forma uniforme y continua resulta problemático y requiere de atención constante si, para establecer una rutina eficaz, se extrae un elevado número de bolsas simultáneamente en el mismo recipiente, ya que chocan unas con otras y desestabilizan el imán. Para obviar esta limitación, en experimentos posteriores, se optó por realizar esta extracción en el aparato de extracción ANKOM 200/220, a temperatura ambiente.

Los análisis generales (MO, almidón, PB, EE) se hicieron según protocolos del Laboratorio del Departamento de Ciencia Animal de la UPV (Moya *et al.*, 2004); brevemente, la MO por incineración a 500 °C, el almidón por hidrólisis enzimática en doble etapa (amilasa termoestable a 100 °C, amiloglucosidasa a 55 °C) seguida de valoración de la glucosa resultante por el método de hexokinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la PB como N Kjeldahl x 6.25.

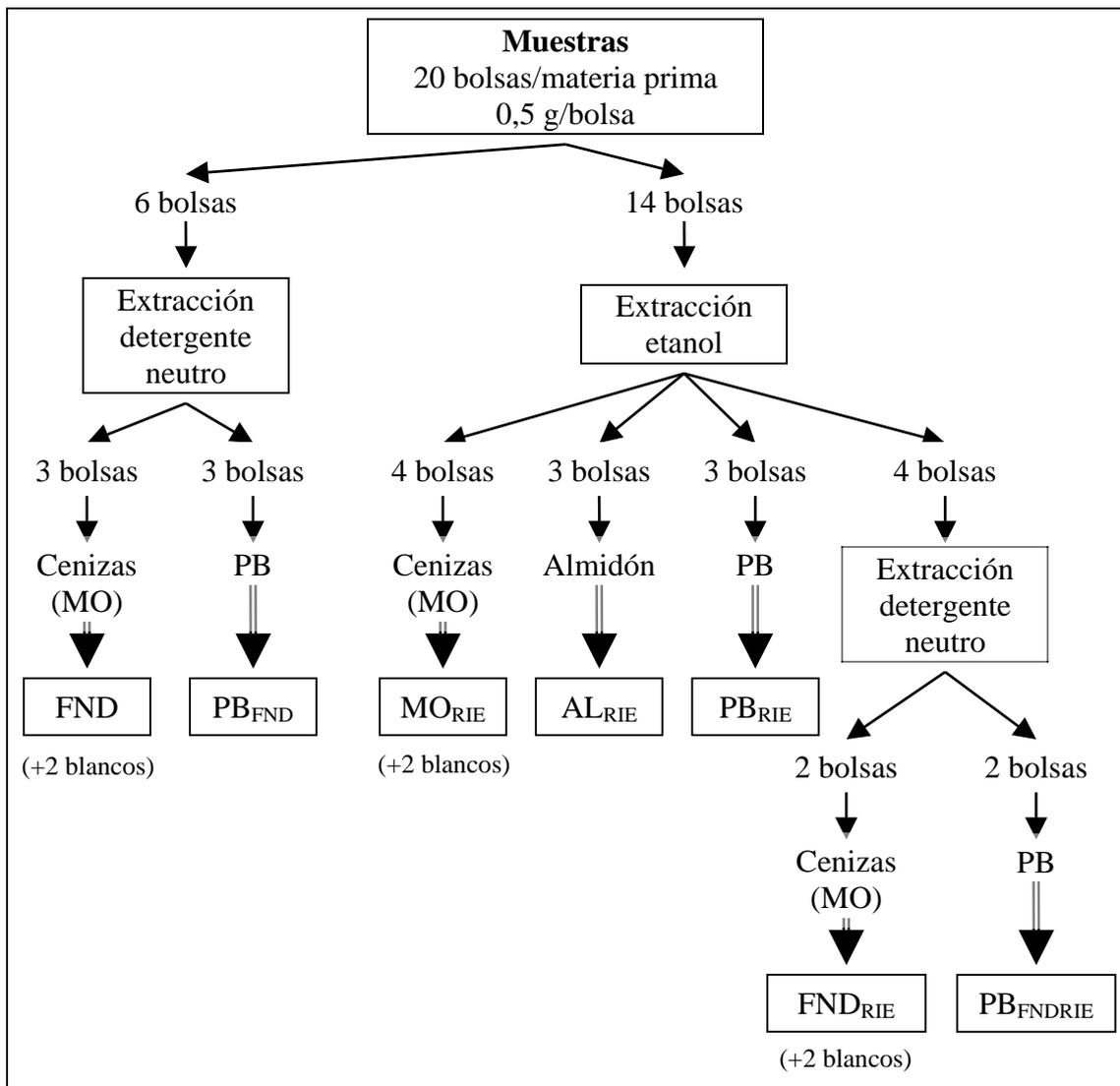
3.1. EXPERIMENTO 1

Este experimento se planteó principalmente para comprobar si la extracción con detergente neutro debe realizarse sobre la muestra íntegra, sin extraer con etanol, tal como se propone en el protocolo original, o sobre su residuo insoluble en etanol (RIE),

como *a priori* parece más lógico, ya que el análisis de la FSDN se fundamenta en cambios de masa en residuos extraídos

Se utilizaron dos materias primas, heno de alfalfa y pulpa de remolacha, de diferente contenido en FSDN (notablemente mayor en la segunda). Se pesaron 20 bolsas (0,5 g) de cada materia prima y 6 bolsas “blanco”, que se utilizaron conforme ilustra la Figura 6. El número de bolsas se adecuó a la capacidad del aparato de extracción ANKOM 200/220, que permite la extracción de 24 bolsas simultáneamente, de forma que todas las extracciones con detergente neutro se realizaran a la vez y así evitar la interferencia que supone la conocida diferencia de eficacia de solubilización entre extracciones distintas. En este caso, la extracción con etanol también se realizó de una sola vez, en un vaso de precipitado de 4 l.

Figura 6.- Esquema del Experimento 1



La Tabla 1 muestra los valores obtenidos para las distintas fracciones en las dos materias primas utilizadas.

Tabla 1.- Resultados del Experimento 1 (% de la MS)

	Heno de alfalfa		Pulpa de remolacha	
MO _{RIE}	Bolsa 1	78,66	Bolsa 5	89,83
	Bolsa 2	77,99	Bolsa 6	90,69
	Bolsa 3	79,08	Bolsa 7	90,27
	Bolsa 4	77,05	Bolsa 8	90,60
	Media	78,19		90,35
	Desviación típica	0,885		0,389
	Coefficiente de variación (%)	1,1		0,4
FND	Bolsa 9	47,11	Bolsa 12	42,34
	Bolsa 10	47,69	Bolsa 13	42,30
	Bolsa 11	48,03	Bolsa 14	42,41
		Media	47,61	
	Desviación típica	0,468		0,058
	Coefficiente de variación (%)	1,0		0,1

FND _{RIE}	Bolsa 15	45,06	Bolsa 17	41,99
	Bolsa 16	47,73	Bolsa 18	41,19
	Media	46,40		41,59
	Desviación típica	1,885		0,568
	Coeficiente de variación (%)	4,1		1,4
AL _{RIE}	Bolsa 19	0,80	Bolsa 22	0,71
	Bolsa 20	0,76	Bolsa 23	0,69
	Bolsa 21	0,59	Bolsa 24	0,69
	Media	0,72		0,69
	Desviación típica	0,108		0,012
	Coeficiente de variación (%)	15,0		1,7
PB _{RIE}	Bolsa 25	11,07	Bolsa 28	6,86
	Bolsa 26	11,14	Bolsa 29	6,94
	Bolsa 27	11,72	Bolsa 30	6,88
	Media	11,31		6,89
	Desviación típica	0,355		0,045
	Coeficiente de variación (%)	3,1		0,7
PB _{FND}	Bolsa 31	3,01	Bolsa 34	4,48
	Bolsa 32	2,47	Bolsa 35	4,34
	Bolsa 33	2,28	Bolsa 36	4,36
	Media	2,59		4,39
	Desviación típica	0,378		0,078
	Coeficiente de variación (%)	14,6		1,8
PB _{FNDRIE}	Bolsa 37	2,02	Bolsa 39	4,58
	Bolsa 38	2,09	Bolsa 40	4,50
	Media	2,05		4,54
	Desviación típica	0,053		0,052
	Coeficiente de variación (%)	2,6		1,1

Para abordar el objetivo principal de este experimento (comprobar si la extracción con detergente neutro debe realizarse sobre la muestra íntegra o sobre su RIE), se procedió a realizar las comparaciones FND vs. FND_{RIE} y PB_{FND} vs. PB_{FNDRIE}, mediante el PROC GLM del paquete estadístico SAS, con el tipo de extracción, la materia prima (heno de alfalfa vs. pulpa de remolacha) y su interacción como efectos fijos.

Como puede verse en la Tabla 2, el valor FND_{RIE} tendió a ser menor que el valor FND en ambas materias primas (P=0,121), lo que induce a pensar que **es probable que haya una cierta fracción de la muestra soluble en etanol pero insoluble en el detergente neutro; con el método original esta fracción se descuenta, indebidamente, dos veces: al extraerse con etanol ya no está incluida en MO_{RIE} y al ser insoluble en detergente neutro forma parte de FND y se vuelve a descontar al**

calcular la diferencia $MO_{RIE} - FND$; este error se evitaría determinando y utilizando para el cálculo FND_{RIE} en lugar de FND .

Por otro lado, en la comparación PB_{FND} vs. PB_{FNDRIE} se observó una interacción con la materia prima, ya que las diferencias, de menor cuantía, fueron de signo distinto con heno de alfalfa que con pulpa de remolacha, aunque una de las tres determinaciones de PB_{FND} en el heno de alfalfa fue probablemente anómala (Tabla 1); independientemente de ello, si llegara a concluirse que la determinación correcta es FND_{RIE} en lugar de FND , la lógica del análisis (y además la rutina de laboratorio) obligaría a determinar y utilizar para el cálculo PB_{FNDRIE} en lugar de PB_{FND} ya que este término se introduce sumando para evitar descontar dos veces la PB que forma parte de la FND.

Tabla 2.- Efecto del tipo de extracción, la materia prima y su interacción sobre la determinación de FND y PB_{FND} (% de la MS)

	Heno de alfalfa	Pulpa de remolacha	$P_{extracción}$	$P_{materia\ prima}$	$P_{ext \times mp}$
FND	47,61	42,35	0,121	<0,001	0,694
FND_{RIE}	46,40	41,59			
PB_{FND}	2,59	4,39	0,232	<0,001	0,056
PB_{FNDRIE}	2,05	4,54			

Lógicamente, las variaciones ilustradas en la Tabla 2 se reflejan en el valor de FSDN, calculado como se describe a continuación:

- a) Según el método original: $FSDN = MO_{RIE} - FND - AL_{RIE} - PB_{RIE} + PB_{FND}$
 Heno de alfalfa: $78,19 - 47,61 - 0,72 - 11,31 + 2,59 = \mathbf{21,14\%}$ de la MS
 Pulpa de remolacha: $90,35 - 42,35 - 0,69 - 6,89 + 4,39 = \mathbf{44,81\%}$ de la MS
- b) Según la modificación: $FSDN = MO_{RIE} - FND_{RIE} - AL_{RIE} - PB_{RIE} + PB_{FNDRIE}$
 Heno de alfalfa: $78,19 - 46,40 - 0,72 - 11,31 + 2,05 = \mathbf{21,81\%}$ de la MS
 Pulpa de remolacha: $90,35 - 41,59 - 0,69 - 6,89 + 4,54 = \mathbf{45,72\%}$ de la MS

En cualquier caso, a la vista del valor de P obtenido en la comparación FND vs. FND_{RIE} , se consideró que **los resultados obtenidos no son suficientemente**

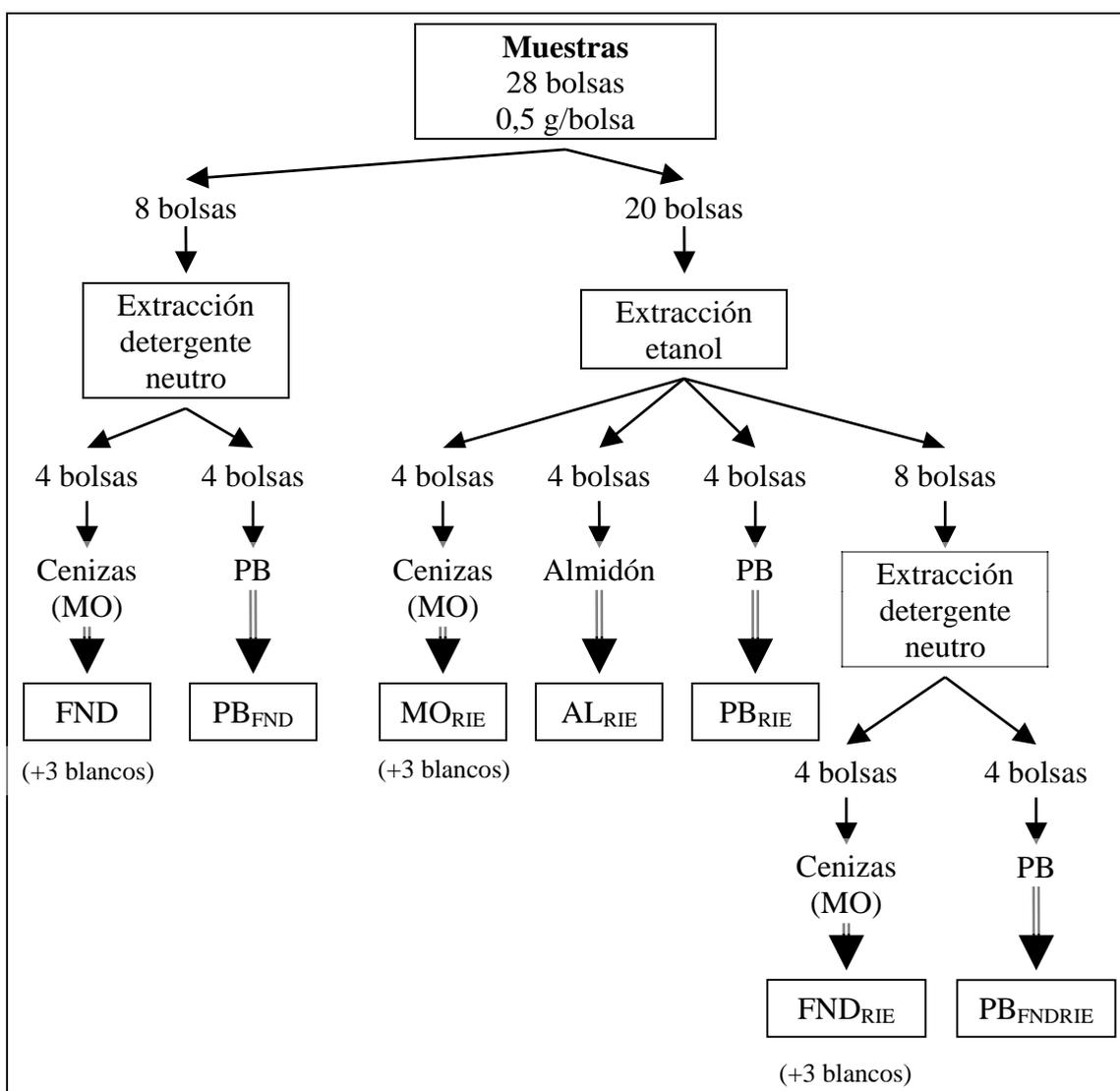
concluyentes, quizá por el escaso número de réplicas (3 bolsas/materia prima para FND y 2 bolsa/materia prima para FND_{RIE}) motivado por la limitante capacidad del aparato de extracción ANKOM 200/220 ya comentada y por la notable diferencia entre las dos determinaciones de FND_{RIE} en el heno de alfalfa (Tabla 1). En consecuencia, se diseñó el experimento siguiente.

3.2. EXPERIMENTO 2

Con este experimento se pretendió confirmar, o no, si resulta necesario realizar la extracción con detergente neutro sobre el RIE de la muestra en lugar de hacerlo sobre la muestra no extraída con etanol; adicionalmente, el experimento permite valorar la reproducibilidad de la determinación de la FSDN.

Se utilizó sólo una materia prima para disponer de más réplicas y mejorar la consistencia estadística de los resultados, que fue el heno de alfalfa analizado en el Experimento 1. Se pesaron 28 bolsas (0,5 g) y 9 bolsas “blanco”, que se utilizaron conforme ilustra la Figura 7. Como en el Experimento 1, el número de bolsas se estableció de forma que todas las extracciones con detergente neutro se realizaran a la vez y la extracción con etanol también se realizó de una sola vez.

Figura 7.- Esquema del Experimento 2



La Tabla 3 muestra los valores obtenidos para las distintas fracciones. De forma análoga al Experimento 1, para comprobar si la extracción con detergente neutro debe realizarse sobre la muestra íntegra o sobre su RIE, se procedió a realizar las comparaciones FND vs. FND_{RIE} y PB_{FND} vs. PB_{FNDRIE}, mediante el PROC GLM del paquete estadístico SAS, con el tipo de extracción como efecto fijo; como puede verse en la Tabla 4, el valor FND_{RIE} fue menor que el valor FND (P=0,004), lo que permite confirmar que hay una cierta fracción de la muestra soluble en etanol pero insoluble en el detergente neutro, que en el caso del heno de alfalfa representó en torno al 1,35% de la MS (1,21% de la MS en el Experimento 1); para evitar el error de descontarla dos veces, de forma general, **se propone modificar el método original utilizando para el cálculo FND_{RIE} en lugar de FND.**

Tabla 3.- Resultados del Experimento 2 (% de la MS)

Heno de alfalfa		
MO _{RIE}	Bolsa 1	75,90
	Bolsa 2	75,73
	Bolsa 3	76,08
	Bolsa 4	76,29
	Media	76,00
	Desviación típica	0,239
	Coeficiente de variación (%)	0,3
FND	Bolsa 5	44,78
	Bolsa 6	45,50
	Bolsa 7	45,68
	Bolsa 8	45,69
	Media	45,41
	Desviación típica	0,431
	Coeficiente de variación (%)	0,9
FND _{RIE}	Bolsa 9	44,14
	Bolsa 10	44,60
	Bolsa 11	43,74
	Bolsa 12	43,78
	Media	44,06
	Desviación típica	0,400
	Coeficiente de variación (%)	0,9
AL _{RIE}	Bolsa 13	0,99
	Bolsa 14	0,88
	Bolsa 15	0,71
	Bolsa 16	0,71
	Media	0,82
	Desviación típica	0,137
	Coeficiente de variación (%)	16,6
PB _{RIE}	Bolsa 17	11,26
	Bolsa 18	11,06
	Bolsa 19	10,83
	Bolsa 20	11,08
	Media	11,06
	Desviación típica	0,176
	Coeficiente de variación (%)	1,6
PB _{FND}	Bolsa 21	2,24
	Bolsa 22	2,67
	Bolsa 23	2,52
	Bolsa 24	2,44
	Media	2,47
	Desviación típica	0,177
	Coeficiente de variación (%)	7,2
PB _{FNDRIE}	Bolsa 25	2,22
	Bolsa 26	2,35
	Bolsa 27	2,11
	Bolsa 28	2,20
	Media	2,22
	Desviación típica	0,096
	Coeficiente de variación (%)	4,3

Tabla 4.- Efecto del tipo de extracción sobre la determinación de FND y PB_{FND} (% de la MS)

	Heno de alfalfa	$P_{extracción}$
FND	45,41	0,004
FND_{RIE}	44,06	
PB_{FND}	2,47	0,049
PB_{FNDRIE}	2,22	

Por otro lado, la diferencia entre PB_{FND} y PB_{FNDRIE} es del mismo signo que la obtenida en el Experimento 1 y estadísticamente significativa, por lo que parece que en el caso del heno de alfalfa, la extracción previa con etanol solubiliza cierta proporción de la PB insoluble en detergente neutro; no obstante, esta diferencia entre PB_{FND} y PB_{FNDRIE} (que es parte de la diferencia entre FND y FND_{RIE}) es, para esta materia prima, de escasa relevancia, ya que sólo supone una leve diferencia en el resultado del cálculo. En cualquier caso, si se propone determinar FND_{RIE} en lugar de FND **se debe determinar PB_{FNDRIE} en lugar de PB_{FND}** , como ya se ha argumentado previamente.

Con los resultados obtenidos, se calculó el contenido en FSDN del heno de alfalfa:

a) Según el método original: $FSDN = MO_{RIE} - FND - AL_{RIE} - PB_{RIE} + PB_{FND}$

$$FSDN = 76,00 - 45,41 - 0,82 - 11,06 + 2,47 = \mathbf{21,18\%}$$
 de la MS

b) Según la modificación: $FSDN = MO_{RIE} - FND_{RIE} - AL_{RIE} - PB_{RIE} + PB_{FNDRIE}$

$$FSDN = 76,00 - 44,06 - 0,82 - 11,06 + 2,22 = \mathbf{22,28\%}$$
 de la MS

La comparación de estos valores con los obtenidos en el Experimento 1 (21,14% y 21,81% de la MS con el método original y con la modificación, respectivamente) aporta un indicio de que la determinación de FSDN parece aceptablemente reproducible, sobre todo si se considera que resulta de analizar 5 fracciones distintas. Las diferencias asociadas a las fracciones AL_{RIE} , PB_{RIE} y PB_{FND} o PB_{FNDRIE} son de escasa cuantía (+0,10%, -0,25% y -0,12% ó +0,17% de la MS, respectivamente) y las asociadas a las fracciones cuyo análisis se basa en procesos de solubilización (MO_{RIE} y FND o FND_{RIE}), que son más relevantes, tendieron a anularse entre sí (-2,19% y -2,20% ó -2,31% de la MS, respectivamente.).

3.3. EXPERIMENTO 3

Con este experimento se pretendió comprobar si era necesario determinar el extracto etéreo del RIE (EE_{RIE}) o realizar una extracción previa con éter, ya que se sabe que la extracción con etanol es eficaz para solubilizar el extracto etéreo de materias primas o piensos de escaso contenido en grasa pero no se dispone de información sobre lo que sucede en el caso de materiales con mayor contenido en grasa.

Se utilizaron dos piensos, con diferente contenido en grasa, P5 y P10, respectivamente con 3% y 6% de grasa añadida y 5,2 y 7,8% de EE (sobre MS). La extracción con etanol se realizó en el aparato de extracción ANKOM 200/220.

La Tabla 5 muestra los valores de EE_{RIE} de los dos piensos utilizados, que se analizaron mediante el PROC GLM del paquete estadístico SAS con el pienso como efecto fijo.

Tabla 5.- Contenido en EE_{RIE} (% de la MS)

	P5		P10		P _p
	Bolsa 1	0,75	Bolsa 3	1,48	
	Bolsa 2	0,61	Bolsa 4	1,30	
Media		0,68		1,39	0,024
Desviación típica		0,101		0,123	
Coefficiente de variación		15,0		8,9	

Como vemos, el RIE contiene todavía cierta cantidad de material soluble en éter, que parece aumentar con el contenido en grasa de la muestra analizada, ya que fue significativamente mayor con P10 que con P5; es reseñable que al duplicarse el contenido en grasa añadida de la muestra se duplicara su contenido en EE_{RIE} , que alcanzó el 1,39% de la MS en P10. Con el método original, esta fracción se contabiliza, erróneamente, como FSDN.

En consecuencia, se propone que **cuando la muestra a analizar contiene cantidades relevantes de grasa (orientativamente, más del 5% de EE) es pertinente determinar e incluir en el cálculo de la FSDN su contenido en EE_{RIE} (restando) o, alternativamente, realizar una extracción previa con éter.**

3.4. EXPERIMENTO 4

Con este experimento se trata de comprobar si es posible introducir más cantidad de muestra en las bolsas sin afectar a la eficacia de la extracciones, con el objeto de poder realizar los análisis sucesivos (MO, almidón, PB) sobre el contenido de una misma bolsa y de esta forma reducir el número de bolsas a extraer, lo que supondría una notable mejora del método al disminuir el coste en material y tiempo.

Se utilizaron cuatro piensos (P1, P3, P5, P10). Se pesaron 4 bolsas/pienso, dos con 0,5 g y dos con 2 g, así como 4 bolsas “blanco”. Todas las bolsas se sometieron a una extracción previa con éter en extractor SOXHLET y después a extracciones sucesivas con etanol y detergente neutro en el aparato de extracción ANKOM 200/220.

La Tabla 6 recoge la proporción de muestra no solubilizada en los distintos piensos en función de la cantidad de muestra introducida en la bolsa, para las extracciones con etanol (RIE) o con etanol y, consecutivamente, detergente neutro (RIEDN). Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de Student para muestras pareadas en una hoja Excel. Como puede verse, la extracción de las bolsas con 2 g de muestra fue incompleta, de forma particularmente notoria para la extracción con detergente neutro, en que apenas se extrajo la mitad del material extraíble. Por tanto, **no parece posible reducir el número de bolsas, ya que aumentando la carga de las mismas queda material soluble sin extraer.** No se descarta la posibilidad de que las extracciones sean eficaces con carga intermedia entre 0,5 y 2 g.

Tabla 6.- Resultados del Experimento 4

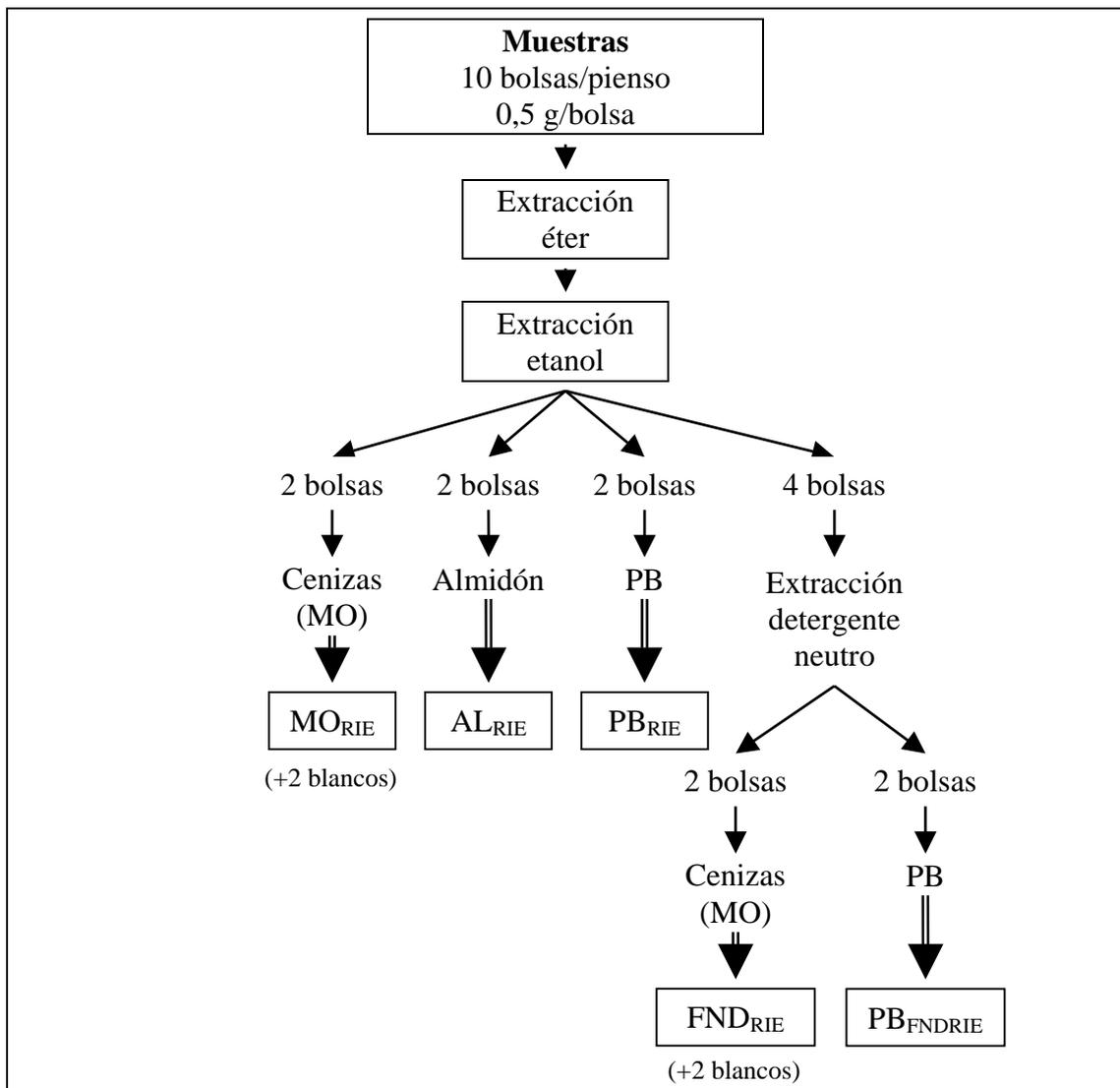
	RIE		RIEDN	
	Bolsa con ≈ 0,5 g	Bolsa con ≈ 2 g	Bolsa con ≈ 0,5 g	Bolsa con ≈ 2 g
P1	0,831	0,868	0,391	0,680
P3	0,827	0,849	0,394	0,708
P5	0,829	0,852	0,397	0,715
P10	0,786	0,826	0,379	0,601
Media	0,818	0,849	0,390	0,676
P	0,004		<0,001	

3.5. EXPERIMENTO 5

Los experimentos anteriores sirvieron para establecer el protocolo a seguir en la determinación de la FSDN, que se detalla en el Anexo. El presente experimento se planteó para validarlo y estimar su reproducibilidad.

Se utilizaron cuatro piensos (P1, P3, P5, P10), que se valoraron en dos periodos de análisis consecutivos. En cada periodo, se pesaron 10 bolsas (0,5 g) de cada pienso y 8 bolsas “blanco”, que se utilizaron conforme ilustra la Figura 8. Todas las bolsas se sometieron a una extracción previa con éter en extractor SOXHLET y después a extracciones sucesivas con etanol y detergente neutro en el aparato de extracción ANKOM 200/220, organizadas en dos tandas (P1+P5 y P3+P10).

Figura 8.- Esquema del Experimento 5



La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para las distintas fracciones de los cuatro piensos utilizados en los dos periodos de análisis.

Tabla 7.- Resultados del Experimento 5 (% de la MS)

	P1		P3		P5		P10	
Periodo 1								
MO _{RIE}	Bolsa 1	76,73	Bolsa 11	77,31	Bolsa 21	76,94	Bolsa 31	71,31
	Bolsa 2	77,47	Bolsa 12	75,99	Bolsa 22	75,13	Bolsa 32	72,74
	Media	77,10		76,65		76,04		72,03
	Desviación típica	0,521		0,935		1,274		1,011
	Coefficiente de variación (%)	0,7		1,2		1,7		1,4
FND _{RIE}	Bolsa 3	35,37	Bolsa 13	36,41	Bolsa 23	37,40	Bolsa 33	36,78
	Bolsa 4	38,67	Bolsa 14	38,74	Bolsa 24	37,83	Bolsa 34	35,57
	Media	37,02		37,57		37,62		36,18
	Desviación típica	2,330		1,650		0,304		0,859
	Coefficiente de variación (%)	6,3		4,4		0,8		2,4
AL _{RIE}	Bolsa 5	16,64	Bolsa 15	9,45	Bolsa 25	3,48	Bolsa 35	2,25
	Bolsa 6	16,08	Bolsa 16	9,38	Bolsa 26	3,32	Bolsa 36	3,66
	Media	16,36		9,42		3,40		2,95
	Desviación típica	0,402		0,049		0,109		0,995

	Coeficiente de variación (%)	2,5	0,5	3,2	33,7			
PB _{RIE}	Bolsa 7	15,19	Bolsa 17	14,24	Bolsa 27	14,47	Bolsa 37	14,10
	Bolsa 8	15,10	Bolsa 18	14,80	Bolsa 28	14,55	Bolsa 38	14,89
	Media	15,14		14,52		14,51		14,49
	Desviación típica	0,059		0,399		0,060		0,556
	Coeficiente de variación (%)	0,4		2,7		0,4		3,8
PB _{FNDRIE}	Bolsa 9	3,17	Bolsa 19	3,61	Bolsa 29	4,99	Bolsa 39	3,60
	Bolsa 10	3,69	Bolsa 20	3,60	Bolsa 30	5,32	Bolsa 40	3,63
	Media	3,43		3,60		5,16		3,61
	Desviación típica	0,367		0,002		0,227		0,018
	Coeficiente de variación (%)	10,7		0,0		4,4		0,5
Periodo 2								
MO _{RIE}	Bolsa 1	79,19	Bolsa 11	77,54	Bolsa 21	77,84	Bolsa31	74,38
	Bolsa 2	78,14	Bolsa 12	77,09	Bolsa 22	77,85	Bolsa32	74,13
	Media	78,67		77,32		77,84		74,26
	Desviación típica	0,742		0,320		0,009		0,179
	Coeficiente de variación (%)	0,9		0,4		0,0		0,2
FND _{RIE}	Bolsa 3	36,83	Bolsa 13	38,92	Bolsa 23	38,69	Bolsa 33	39,68
	Bolsa 4	34,61	Bolsa 14	38,09	Bolsa 24	37,84	Bolsa 34	40,20
	Media	35,72		38,51		38,27		39,94
	Desviación típica	1,574		0,587		0,602		0,366
	Coeficiente de variación (%)	4,4		1,5		1,6		0,9
AL _{RIE}	Bolsa 5	17,83	Bolsa 15	10,45	Bolsa 25	4,87	Bolsa 35	4,31
	Bolsa 6	17,33	Bolsa 16	9,73	Bolsa 26	4,99	Bolsa 36	4,29
	Media	17,58		10,09		4,93		4,30
	Desviación típica	0,354		0,505		0,083		0,016
	Coeficiente de variación (%)	2,0		5,0		1,7		0,4
PB _{RIE}	Bolsa 7	16,39	Bolsa 17	15,67	Bolsa 27	15,31	Bolsa 37	15,28
	Bolsa 8	16,21	Bolsa 18	15,50	Bolsa 28	15,30	Bolsa 38	14,64
	Media	16,30		15,58		15,30		14,96
	Desviación típica	0,129		0,121		0,006		0,451
	Coeficiente de variación (%)	0,8		0,8		0,0		3,0
PB _{FNDRIE}	Bolsa 9	2,66	Bolsa 19	4,11	Bolsa 29	3,81	Bolsa 39	4,78
	Bolsa 10	2,68	Bolsa 20	4,28	Bolsa 30	3,92	Bolsa 40	4,75
	Media	2,67		4,20		3,87		4,77
	Desviación típica	0,014		0,122		0,081		0,018
	Coeficiente de variación (%)	0,5		2,9		2,1		0,4

Tabla 8.- Contenido en FSDN de los piensos estudiados en dos periodos de análisis (% de la MS)

	Periodo 1	Periodo 2
P1	12,01	11,74
P3	18,74	17,34
P5	25,67	23,21
P10	22,02	19,83
Media	19,61	18,03
P	0,024	

La Tabla 8 resume los valores de FSDN obtenidos para los cuatro piensos en los dos periodos de análisis, analizados mediante la prueba *t* de Student para muestras pareadas en una hoja Excel; como puede observarse, los valores correspondientes al

Periodo 2 fueron sistemáticamente más bajos, con diferencias que parecen aumentar con el contenido en FSDN ya que oscilaron desde 0,27% en P1 hasta 2,46% en P10. Por otro lado, cuando los resultados se sometieron al PROC GLM del paquete estadístico SAS con el pienso como efecto fijo, la desviación típica residual fue 1,27%, lo que supone un coeficiente de variación de 6,74%. Con todo ello, y teniendo también en consideración los resultados obtenidos con heno de alfalfa (Experimentos 1 y 2), **el método propuesto para la determinación de la FSDN parece suficientemente reproducible, sobre todo si se considera que resulta de analizar 5 fracciones distintas.**

Con independencia de ello, debe resaltarse que **las diferencias observadas entre los piensos valorados son notablemente congruentes con la composición de los mismos**, aun cuando en ambos periodos de análisis las extracciones con etanol y con detergente neutro no se realizaron simultáneamente en los cuatro piensos sino en dos tandas de dos piensos, lo que probablemente supone una pérdida de precisión analítica. Como puede verse en la Tabla 9, P1 y P5 difieren principalmente en los niveles de inclusión de trigo y pulpa de remolacha (28-0% y 0-28% en P1 y P5, respectivamente), mientras que P3 es la media aritmética de los anteriores; en consecuencia, el contenido en FSDN es claramente mayor en P5 que en P1 e intermedio en P3 (en el análisis del Periodo 1: 6,93% menos que P5 y 6,73% más que P1; en el análisis del Periodo 2: 5,87% menos que P5 y 5,60% más que P1). Por otro lado, la diferencia entre P5 y P10 radica en la sustitución de 4% de pulpa de remolacha por 3% de grasa animal y 1% de melaza; teniendo en cuenta que el contenido en FSDN de la pulpa de remolacha está en torno a 46% (Experimento 1) y que tanto en la grasa animal como en la melaza puede considerarse nulo, la reducción esperable es de 1,84%, habiéndose observado diferencias de 3,38% y 3,65% en los análisis del Periodo 1 y Periodo 2, respectivamente.

Tabla 9.- Composición en ingredientes de los piensos utilizados (% de la MS)

	P1	P3	P5	P10
Trigo	28	14		
Pulpa de remolacha		14	28	24
Salvado de trigo		7.5	15	15
Cascarilla de soja	10	5		
Paja de cereal	5	2.5		
Grasa animal	3	3	3	6
Melaza				1
Mezcla basal ^a	54	54	54	54

^a Alfalfa, 25%; torta de girasol, 20%; torta de soja, 6%; L-lisina HCl, 0.3%; DL-metionina, 0.1%; L-treonina, 0.1%; carbonato cálcico, 0.2%; fosfato bicálcico, 1.2%; sal, 0.5%; corrector, 0.5%

4. CONCLUSIONES

En relación con la determinación de la fibra soluble en detergente neutro (FSDN), las principales conclusiones del trabajo realizado son:

1. Las extracciones con etanol y detergente neutro pueden realizarse utilizando el sistema ANKOM (bolsas, aparato de extracción).
2. Se propone realizar la extracción con detergente neutro sobre el residuo insoluble en etanol de la muestra en lugar de hacerla directamente sobre la muestra como se recoge en el método original, ya que hay una cierta fracción que es soluble en etanol pero insoluble en detergente neutro; de esta forma se evita el error de descontarla dos veces, que supone una subestimación del contenido en FSDN.
3. De igual forma, se propone analizar la proteína bruta (PB) ligada a la fibra neutro detergente (FND) sobre el residuo resultante de extracciones consecutivas con etanol y detergente neutro, en lugar de hacerlo sobre el residuo resultante de la extracción directa con detergente neutro como indica el método original.
4. Se propone realizar una extracción previa con éter de las muestras relativamente ricas en grasa (orientativamente, con extracto etéreo superior al 5%), ya que en tales casos hay una parte relevante de la misma que no se solubiliza en etanol y que con el método original se contabiliza erróneamente como FSDN.
5. No parece posible reducir el número de bolsas utilizado para las extracciones aumentando su carga hasta 2 g, ya que entonces queda material soluble sin extraer, de forma particularmente notoria con detergente neutro.
6. El método propuesto para la determinación de FSDN, con las diferentes modificaciones realizadas sobre el original, parece suficientemente reproducible teniendo en cuenta que se trata del cómputo de varios análisis.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **CARPITA, N.C.** (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 445-476.
- ❖ **CARRÉ, B.; BRILLOUET, J.M.** (1989). Determination of water insoluble cell-walls in feeds: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 463-467.
- ❖ **DARLING, D.** (2008). Cell wall.
<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html> (10 de Noviembre de 2008).
- ❖ **GARCÍA BREIJO, F.J.** (2008). La pared celular vegetal.
<http://www.etsmre.upv.es/varios/biologia/> (10 de Noviembre de 2008).
- ❖ **GIDENNE, T.** (2003). Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.*, 81: 105-117.
- ❖ **HALL, M.B.; LEWIS, B.A.; VAN SOEST, P.J.; CHASE, L.E.** (1997). A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fibre. *J. Sci. Food Agric.*, 74: 441-449.
- ❖ **HALL, M.B.; PELL, A.N.; CHASE, L.E.** (1998). Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 70: 23-29.
- ❖ **HALL, M.B.; HOOVER, W.H.; JENNINGS, J.P.; MILLER WEBSTER, T.K.** (1999). A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 2079-2086.
- ❖ **HOLM, J.; BJÖRK, I.; DREWS, A.; ASP, N.G.** (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Stach/Starke*, 7: 224-226.

- ❖ **LI, B.W.** (1995). Determination of total dietary fiber in foods and food products by using a single-enzyme enzymatic-gravimetric method: interlaboratorial study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 78: 1440-1444.

- ❖ **MOYA, V.J.; PASCUAL, J.J.; CERVERA, C.** (2004). Manual de prácticas de nutrición animal: análisis de piensos y materias primas. Editorial UPV. Valencia. 75 pp.

- ❖ **VAN SOEST, J.P.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.** (1991). Method for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583-3597.

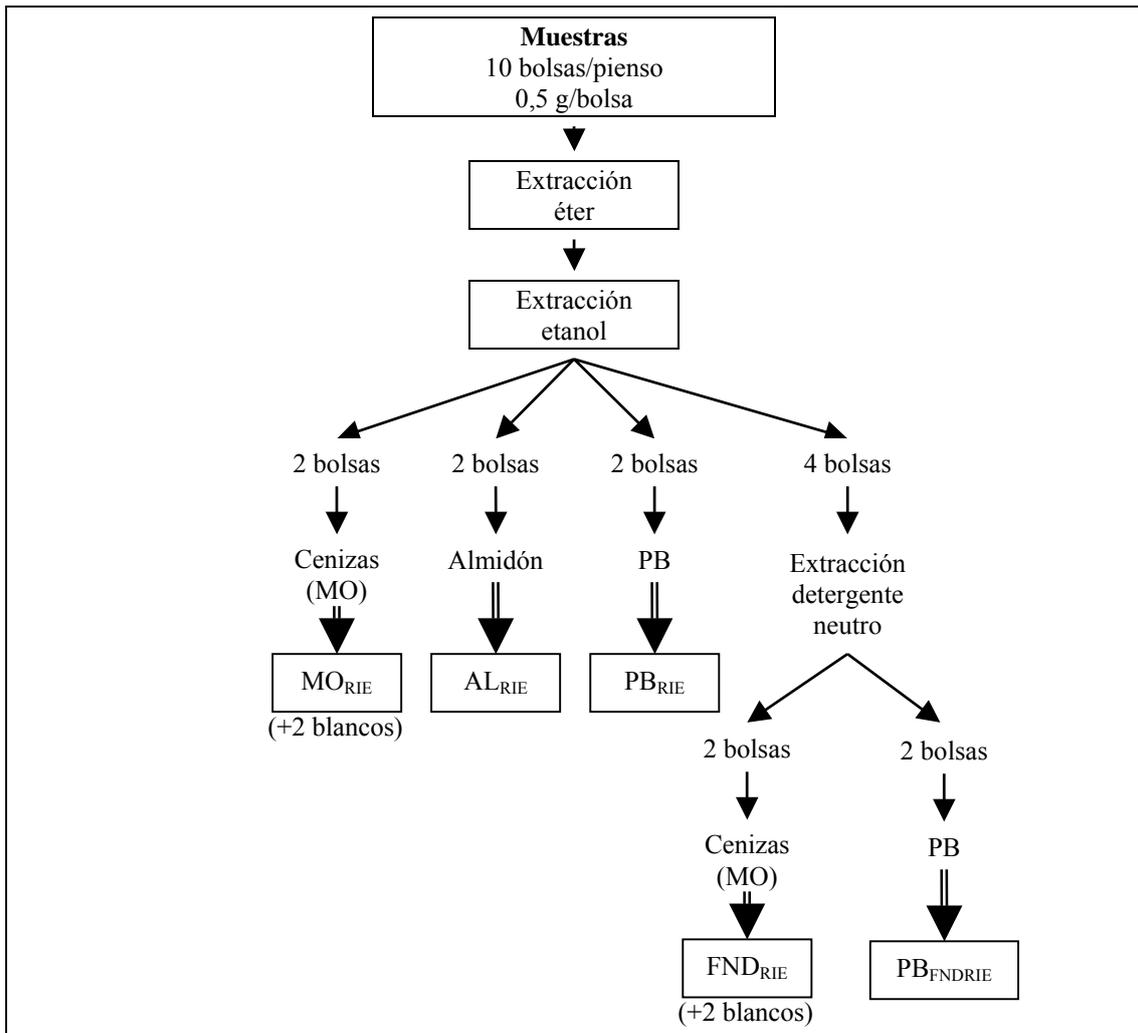
6. ANEXO

PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE LA FSDN

Nota previa:

En el método original de Hall *et al.* (1997, 1998, 1999) se equilibra la MS de la muestra, de su RIE o de su residuo insoluble en detergente neutro a la humedad ambiental y posteriormente se determina su contenido en MS. Para simplificar el procedimiento y disminuir el riesgo de errores, el protocolo que se describe a continuación se lleva a cabo sobre MS, es decir, todas las pesadas se realizarán después de mantener la muestra, su RIE o su residuo insoluble en etanol y en detergente neutro (RIEDN) en estufa a 103°C durante 24 horas y a continuación en un desecador durante 30 minutos.

Esquema:



1. PREPARACIÓN DE RIEs:

- 1.1. Dejar las muestras a analizar en estufa de desecación a 103°C durante 24 horas.
- 1.2. Pesar las bolsas ANKOM (P_B) y a continuación introducir 0.5 g de muestra aproximadamente (P_M); sellarlas y extender de forma uniforme la muestra en el interior de las bolsas. Pesar 10 bolsas/muestra y 4 bolsas “blanco”.
- 1.3. Extracción de la grasa de todas las bolsas con éter de petróleo, utilizando el extractor Soxhlet, durante 6 horas (hasta 5 bolsas/extractor); a continuación dejar evaporar el éter sobre papel de filtro 10 minutos y después en estufa a 60°C durante 1 hora. Recuperar el éter.
- 1.4. Extracción de todas las bolsas con etanol:agua (90:10) en el extractor ANKOM a temperatura ambiente (sin calentar ni cerrar la tapa, sólo dejarla caer) durante 4 horas; lavar 2 veces con 0.5 l de etanol:agua en un vaso de precipitado; volver

a lavar 2 veces con acetona en vaso de precipitado todas las bolsas excepto las 4 bolsas/muestra que tienen como finalidad la determinación de $P_{B_{RIE}}$ (2) y $P_{B_{FNDRIE}}$ (2). Secar en estufa a 103°C durante 24 horas. Recuperar el etanol.

1.5. Pesar las bolsas (P_{RIE}).

2. PREPARACIÓN DE RIEDNs:

2.1. Extraer con solución neutro detergente las bolsas destinadas a FND_{RIE} (2) y $P_{B_{FNDRIE}}$ (2) según Moya *et al.* (2004), con la excepción de no lavar las muestras destinadas a $P_{B_{FNDRIE}}$ (2) con acetona.

2.2. Secar en estufa a 103°C durante 24 horas.

2.3. Pesar las bolsas (P_{RIEDN}).

3. DETERMINACIÓN DE LA MO:

La MO del RIE (2) y del RIEDN (2) se analizarán según Moya *et al.* (2004), por incineración a 500 °C, con una modificación: los crisoles no se pesan antes de colocar las bolsas, sino después de pasar por la mufla, con las cenizas e, inmediatamente después, sin ellas, obteniéndose por diferencia su peso (P_{CENRIE} y $P_{CENRIEDN}$, repectivamente).

4. DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN:

El almidón del RIE (2) se analizará según Moya *et al.* (2004), por hidrólisis enzimática en dos etapas (amilasa termoestable a 100 °C, amilogucosidasa a 55 °C) seguida de valoración de la glucosa resultante por el método de hexokinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se pesará alrededor de 0.1 g de muestra del RIE extraído de una bolsa (P_{RIEAL}); a la hora calcular, para expresar el contenido de AL_{RIE} como % de la MS de la muestra original, este peso debe dividirse por la proporción de la muestra que es insoluble en etanol.

5. DETERMINACIÓN DE LA PB:

La PB del RIE (2) y del RIEDN (2) se analizarán según Moya *et al.* (2004), como N Kjeldahl x 6.25, extrayendo y pesando todo el contenido de las bolsas correspondientes (P_{RIEPB} y $P_{RIEDNPB}$, respectivamente); a la hora calcular, para expresar el contenido de PB_{RIE} y PB_{FNDRIE} como % de la MS de la muestra original, estos pesos deben dividirse respectivamente por la proporción de la muestra que es insoluble en etanol y por que es insoluble en etanol y detergente neutro.

6. CÁLCULOS:

Todas las fracciones se expresan como % de la MS de la muestra original. Los pesos están expresados en g.

$$MO_{RIE} = (P_{RIE} - (P_B \times f_{ibe}) - (P_{CENRIE} - P_B \times c_{be}) \times 100 / P_M$$

siendo:

- f_{ibe} = proporción de la bolsa insoluble en etanol (media:0.9954, intervalo de confianza $\alpha=0.05$: 0.9946-0.9962)
- c_{be} = proporción de cenizas en la bolsa extraída con etanol (sobre el peso de la bolsa sin extraer) (media:0.0036, intervalo de confianza $\alpha=0.05$: 0.0032-0.0040)

$$FND_{RIE} = (P_{RIEDN} - (P_B \times f_{ibedn}) - (P_{CENRIEDN} - P_B \times c_{bedn}) \times 100 / P_M$$

siendo:

- f_{ibedn} = proporción de la bolsa insoluble en etanol y en detergente neutro (media:0.9965, intervalo de confianza $\alpha=0.05$: 0.9955-0.9975)
- c_{bedn} = proporción de cenizas en la bolsa extraída con etanol y con detergente neutro (sobre el peso de la bolsa sin extraer) (media:0.0043, intervalo de confianza $\alpha=0.05$: 0.0037-0.0049)

$$AL_{RIE} = G \times f_g \times V \times 90 \times (P_{RIE} - (P_B \times f_{ibe}) / P_M) / P_{RIEAL}$$

siendo:

- G = concentración de la solución de glucosa (g/l)
- f_g = factor de dilución de la solución de glucosa
- V = volumen del matraz aforado (ml)

$$\mathbf{PB_{RIE}} = \text{CIH gastado (ml)} \times f_{\text{HCl}} \times 0.875 \times (\mathbf{P_{RIE}} - (\mathbf{P_B} \times f_{\text{ibe}}) / \mathbf{P_M}) / \mathbf{P_{RIE}PB}$$

siendo f_{HCl} el factor del HCl 0.01N

$$\mathbf{PB_{FNDRIE}} = \text{CIH gastado (ml)} \times f_{\text{HCl}} \times 0.875 \times (\mathbf{P_{RIEDN}} - (\mathbf{P_B} \times f_{\text{ibedn}}) / \mathbf{P_M}) / \mathbf{P_{RIEDNPB}}$$

$$\mathbf{FSDN} = \mathbf{MO_{RIE}} - \mathbf{FND_{RIE}} - \mathbf{AL_{RIE}} - \mathbf{PB_{RIE}} + \mathbf{PB_{FNDRIE}}$$