



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Efecto del nivel de arginina del pienso sobre el balance
proteico en conejos de engorde

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Andrade Villafuerte, Jazmín Carolina

Tutor/a: Pascual Amorós, Juan José

Cotutor/a: Peixoto Gonçalves, Catarina Alexandra

Director/a Experimental: LOPEZ LUJAN, M^a DEL CARMEN

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

EFEECTO DEL NIVEL DE ARGININA DEL PIENSO
SOBRE EL BALANCE PROTEICO EN CONEJOS
DE ENGORDE

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Autor: Jazmín Carolina Andrade Villafuerte

Tutor: Juan José Pascual Amorós

Cotutor: Catarina Alexandra Peixoto Gonçalves

Curso académico: 2022-2023

Valencia, 11 de Septiembre de 2023

TITULO: EFECTO DEL NIVEL DE ARGININA DEL PIENSO SOBRE EL BALANCE PROTEICO EN CONEJOS DE ENGORDE

RESUMEN

Una vez definidos los niveles adecuados para la relación de proteína digerible/energía digerible y para los tres primeros aminoácidos limitantes en conejos de engorde de alta velocidad de crecimiento (lisina, metionina y treonina), el objetivo de este trabajo fue determinar el nivel adecuado de arginina para maximizar el crecimiento en conejos seleccionados por velocidad de crecimiento durante el engorde.

En el experimento se formularon y fabricaron 5 piensos experimentales isonutritivos, que solo diferirán en su contenido en arginina (6.5, 9.6, 11.1, 13.2 y 14.9 g/kg MS) y que se distribuyeron ad libitum a un total de 103 gazapos destetados con 28 días de vida, pertenecientes a 2 líneas genéticas distintas, una maternal (LP; n=61) y otra paternal (RLP; n=42). Los 103 conejos fueron sacrificados por punción intracardiaca a los 63 días de vida. Por otra parte, se sacrifican otros 20 gazapos a los 28 días para conocer el estado inicial de los animales al destete. Se obtuvo el cuerpo vacío de los animales (eliminando el contenido digestivo), que fueron congelados, troceados y triturados para obtener una muestra significativa de la que se obtuvo el contenido en materia seca, cenizas, proteína, energía para realizar el balance proteico.

Tras los análisis tanto analíticos como estadísticos se llegó a la conclusión de que las recomendaciones de nivel de arginina establecido de 10 g de arginina/kg MS nos permite maximizar dicha retención de proteína y la ganancia media diaria de los conejos de engorde. Por otra parte, parecen existir posibles interacciones de la arginina con otros aminoácidos, que podrían estar afectando a la eficacia de retención de la proteína, que merecería investigarse en un futuro.

Palabras claves: conejo; arginina; necesidades; balance; proteína; eficacia alimentaria

TITLE: EFFECT OF DIETARY ARGININE LEVEL ON THE PROTEIN BALANCE IN FATTENING RABBITS

ABSTRAT

Having defined the appropriate levels for the digestible protein/digestible energy ratio and for the first three limiting amino acids in high growth rate fattening rabbits (lysine, methionine, and threonine), the objective of this work was to determine the appropriate level of arginine to maximize growth in rabbits selected for growth rate during fattening.

In the experiment, 5 isonutritive experimental feeds, differing only in their arginine content (6.5, 9.6, 11.1, 13.2 and 14.9 g/kg DM) were formulated and manufactured and distributed ad libitum to a total of 103 young rabbits 28-day old rabbits, belonging to 2 different genetic lines, one maternal (LP; n=61) and one paternal (RLP; n=42). The 103 rabbits were sacrificed by intracardiac puncture at 63 days of life. On the other hand, another 20 young rabbits were sacrificed at 28 days old to know the initial state of the animals at weaning. The empty carcasses of the animals were obtained (eliminating the digestive content), which were frozen, chopped and crushed to obtain a significant sample from which the dry matter, ash, protein, and energy content were obtained in order to perform the protein balance.

After both analytical and statistical analyses, it was concluded that the recommended arginine level of 10 g arginine/kg DM allows us to maximize protein retention and average daily gain of fattening rabbits. In addition, there also seems to be possible interactions of arginine with other amino acids, which could be affecting the efficiency of protein retention, which would be worth investigating in the future.

Keywords: rabbit; arginine; needs; balance; protein; food efficiency

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis tutores Juanjo y Cati y técnicos de laboratorio Mari Carmen, Luis, Javi y Jorge, por su dedicación, su apoyo y por darme la oportunidad de participar en este trabajo mejorando mi formación, tanto académica como profesionalmente.

Durante este camino que culmina con la presentación de este proyecto he tenido el placer de poder conocer y colaborar con varias personas de los cuales he adquirido mucho conocimiento como profesores durante todo el grado y máster.

También agradecer a mi familia, sobre todo a mi madre, y amigos por apoyarme y celebrar cada instante de este largo camino.

Abreviaturas

MS: Materia seca

PD: Proteína digestible

ED: Energía digestible

GMD: Ganancia media diaria

IC: Índice de conversión

SAS: Statistical Analysis Systems

PB: Proteína bruta

Ce: Cenizas

PV: Peso vivo

PCV: Peso cuerpo vacío

CV: Coeficiente de variación

D.E: Desviación estándar

SEM: Error estándar de la media

ÍNDICE

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 1.1 | Producción cunícola | 1 |
| 1.2 | Líneas de producción seleccionadas por su velocidad de crecimiento | 2 |
| 1.3 | Nutrición proteica..... | 3 |
| 2 | Objetivos | 4 |
| 3 | Material y métodos | 4 |
| 3.1 | Dietas experimentales | 5 |
| 3.2 | Animales y procesado de muestras..... | 6 |
| 3.3 | Análisis químico | 8 |
| 3.4 | Cálculos y análisis estadístico..... | 8 |
| 4 | Resultados..... | 8 |
| 5 | Conclusiones..... | 14 |
| 6 | Bibliografía..... | 16 |

Índice de tablas

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 1. | Ingredientes y composición química de la mezcla basal. | 5 |
| Tabla 2. | Composición química de los piensos experimentales (g/kg MS). | 6 |
| Tabla 3. | Composición química a los 28 días..... | 9 |
| Tabla 4. | Pesos y composición química a los 63 días de vida. | 10 |
| Tabla 5. | Efecto de los piensos experimentales y de las líneas genéticas en parámetros de crecimiento..... | 11 |
| Tabla 6. | Efecto de los piensos experimentales y de las líneas genéticas en el balance proteico. | 12 |

Índice de figuras

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Cruce a tres vías. | 2 |
| Figura 2. | Corte de cinta. y Figura 3. Trituradora tipo “Cutter” | 7 |
| Figura 4. | Liofilizado y Figura 5. Molino con tamiz 1 mm..... | 7 |
| Figura 6. | Recta regresión entre el peso vivo y el contenido en proteína del cuerpo vacío a los 28 días. | 9 |
| Figura 7. | Rectas regresión entre el peso vivo y el contenido en proteína del cuerpo vacío a los 28 días en función de la línea genética (RLP en azul y LP en naranja). | 10 |
| Figura 8. | Evolución de la ganancia media diaria, retención de proteína y eficacia de retención de la proteína en los animales de las líneas LP (naranja) y RLP (azul) con el nivel de arginina del pienso. | 14 |

1 Introducción

En la nutrición de conejos de engorde, las características de la dieta son determinantes en el crecimiento y rendimiento de los conejos.

Se recomienda que la dieta de los conejos de engorde esté compuesta principalmente por pienso compuesto, que es un alimento balanceado formulado específicamente para ellos. Este pienso debe cumplir con los requerimientos nutricionales de los conejos en términos de proteína, energía, vitaminas, minerales... (De Blas y Mateos, 2020).

Sin embargo, estas necesidades deben ser revisadas con frecuencia a medida que la selección genética de las líneas utilizadas va cambiando las exigencias nutricionales de los animales. En el caso de los animales seleccionados por alta velocidad de crecimiento, Marín-García et al. (2020a) observó que las actuales recomendaciones para los primeros aminoácidos, como son la lisina, los aminoácidos azufrados (metionina y cistina) y la treonina (8.1, 5.8 y 6.9 g/kg materia seca (MS), respectivamente) no eran los que maximizaban el crecimiento. En dicho trabajo observan que la combinación 8.1, 6.6 y 5.7 g/kg MS, respectivamente, era la que permitía optimizar el crecimiento de estos animales. Así mismo, Della Badia (2019) observó que estos animales de alta velocidad de crecimiento mejoraban sensiblemente su desarrollo cuando se aumentaba la relación de proteína digestible (PD)/ energía digestible (ED) de las actuales recomendaciones (10.7 g/MJ) a 12.2 g/MJ.

Estos resultados nos indican claramente que debemos seguir ahondando en cómo el tipo genético y el nivel de selección pueden estar afectando a las necesidades nutricionales de los animales para ser capaces de ofertarle un pienso que les permita cubrir dichas necesidades y expresar todo su potencial genético.

1.1 Producción cunícola

La carne de conejo es una buena fuente de nutrientes, aportando principalmente una gran cantidad de proteínas de alta calidad. Además, tiene un bajo contenido en grasa y es de fácil digestión, lo que le confieren un elevado valor nutricional, y también tiene una gran importancia en la dieta mediterránea. Desde los años 80, la producción cunícola se hizo popular y aunque su consumo sea minoritario, se trata de un producto valioso sobre todo en países mediterráneos.

Actualmente la producción de carne de conejo se enfrenta a un periodo crítico tanto en los sistemas de producción, que cada vez tienen un costo más elevado, como por su consumo vaya en disminución dado por el cambio de las tendencias de consumo.

La producción de carne de conejo en granjas comerciales modernas se basa actualmente en el uso del cruce a 3 vías con líneas especializadas (Figura 1; Baselga y Blasco, 1989), donde a partir del cruce de dos líneas maternas se obtiene las hembras F1 que se cruzan con machos de aptitud cárnica y de ahí se obtiene los conejos para engorde. Tanto en los núcleos de selección, como en el de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV), se selecciona a los futuros reproductores por los caracteres de mayor peso económico, como son el tamaño de camada al destete y la velocidad de crecimiento durante el engorde (Cartuche et al., 2014).

El objetivo por conseguir es tener un elevado número de gazapos con un alto crecimiento, habitualmente correlacionado con un buen índice de transformación de pienso en carne (kg pienso consumido/kg de peso vivo obtenido), es decir, que se produzca la mayor cantidad de carne al menor coste posible.

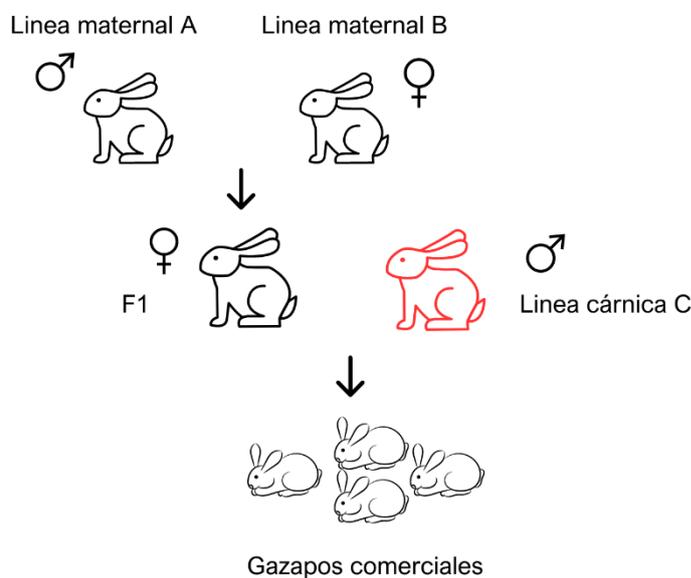


Figura 1. Cruce a tres vías.

1.2 Líneas de producción seleccionadas por su velocidad de crecimiento

La labor de selección genética del conejo de carne en la UPV empezó en los años 80 desarrollando líneas sintéticas comerciales con la idea de brindar al sector cunícola líneas genéticas competitivas.

Actualmente, la UPV dispone de 4 líneas maternas cuyo objetivo principal es mejorar el tamaño de camada al destete. Las líneas son: A (línea amarilla) y V (línea verde), ambas seleccionadas por tamaño de camada al destete, H línea fundada por criterios de hiperproliferidad al nacimiento y LP línea fundada por criterios de longevidad-productiva. También existe una línea paterna R (línea rosa) que ha sido seleccionada por su ganancia media diaria (GMD) durante la fase del engorde (28-63 días de vida). Hasta ahora, las líneas sintéticas comerciales de la UPV han llegado a la generación 48 en la línea A, 44 en la línea V, 25 en la línea H y 14 en la línea LP, así como en línea R a la generación 39. Desde que se fundaron, todas las líneas se han mantenido cerradas en el mismo núcleo de selección, y sometidas a un mismo programa de selección y de gestión (Ragab et al., 2015).

Como hemos indicado anteriormente, la selección de las líneas paternas es uno de los objetivos de la selección genética en conejos, que está caracterizada por la elevada velocidad de crecimiento e indirectamente debería mejorar el índice de conversión (IC) (Baselga, 2004). Así, dichas líneas logran una mayor GMD durante el periodo de crecimiento, y mejoran indirectamente la eficacia alimentaria, que se considera uno de los rasgos económicos más importantes en la producción cunícola (Cartuche et al., 2014).

La línea R proviene del cruce de dos líneas paternas, una fundada en 1976 de conejos californianos criados por agricultores valencianos y otra fundada en 1981 de conejos que forman parte de las líneas paternas especializadas (Estany et al., 1992). La línea R se fundó a mediados de los 80 y ha sido seleccionada exclusivamente por la GMD aumentando así su ganancia de peso individual (Blasco et al., 2003). Se tratan de animales grandes con pesos muy por encima de los ejemplares no seleccionados por dicho criterio.

La línea LP se fundó en 2003 con los criterios de longevidad y reproducción. Esta línea maternal tiene como característica principal su gran resiliencia. Para ello se seleccionaron madres que fueron capaces de realizar 25 partos con mínimo de 7,5 gazapos nacidos vivos por parto (Saviotto et al., 2015). Por todo esto a las hembras LP se les permite mantener un alto nivel reproductivo (Theilgaard et al., 2009), un buen peso de la camada a la hora del destete (García-Quirós et al., 2014; Arnau-Bonachera et al., 2018) y una gran capacidad en el momento de hacer frente a los desafíos inmunológicos (Ferrián et al., 2012; 2013).

Finalmente, la línea RFLP se constituyó mediante retro cruzamientos de las línea RF, una línea obtenida mediante la selección de conejos “élite” (alta velocidad de crecimiento) de la línea R disponibles en los diferentes núcleos asociados a la UPV, con la línea LP, con el objetivo de mejorar las características productivas y de resiliencia de la línea R. Pueden obtener más información sobre estas dos nuevas líneas en el trabajo de (Peixoto-Gonçalves et al., 2023a).

1.3 Nutrición proteica

Desde el punto de vista de la nutrición se necesita realizar la correcta aportación de nutrientes en las dietas para que cubran correctamente todas las necesidades nutricionales requeridas por los animales.

En este sentido, es importante destacar que la relación entre la ED y la PD es fundamental para asegurar una adecuada nutrición proteica en los conejos de cebo. Diversos estudios como el de Paya et al. (1978) han recogido que la relación PD/ED debe ser cuidadosamente equilibrada para favorecer un crecimiento óptimo y una mayor eficiencia en la conversión de alimento en peso corporal.

La nutrición proteica en los conejos de cebo es un aspecto clave para asegurar un crecimiento y rendimiento óptimo. Es importante seguir las recomendaciones de expertos en nutrición animal como FEDNA y adaptar la dieta a las necesidades específicas de los conejos de cebo. Una correcta relación PD/ED, como determina Della Badia, A. (2019), favorecerá un crecimiento saludable y una mayor eficiencia en la conversión alimenticia.

Además, es necesario tener en cuenta que el manejo y la alimentación adecuada de los conejos de cebo no solo afecta su crecimiento y rendimiento, sino también su bienestar general. Proporcionar una dieta equilibrada y de calidad, junto con el acceso constante a agua fresca y una buena higiene en los hábitats, contribuirá a que los conejos de cebo se mantengan saludables y se desarrollen de manera óptima.

Las proteínas son uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de los animales, ya que se tratan de macromoléculas que están formadas por una o más cadenas de aminoácidos. Dentro de los aminoácidos se puede diferenciar en aquellos

que el animal puede sintetizar por sí mismo (no esenciales) y los que no se pueden sintetizar (esenciales) y los tiene que adquirir de forma externa.

Así mismo, un aminoácido esencial puede ser limitante dado que se integra por la dieta y puede ser insuficiente. Los aminoácidos limitantes más recurrentes para cerdos, aves y conejos son la lisina, treonina, metionina y cisteína (De Blas y González-Mateos, 2020; Bonato et al., 2015; Van-Milgen y Dourmad, 2015).

Sin embargo, otros aminoácidos también son esenciales para el crecimiento de los animales (Gaman y Fisher, 1970; Adamson y Fisher, 1976), como la arginina que se recomienda una concentración del 1% en la dieta de los conejos (McWard et al., 1967; Colin, 1975). La L-arginina (CE 3.6.1; C₆H₁₄N₄O₂) se trata de un aminoácido que se obtiene mediante fermentación aerobia a partir de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13870) (FEDNA).

En el caso de los conejos de engorde necesitan un aporte de proteína justa y con la calidad adecuada. Desde la nutrición la falta de un aminoácido esencial puede provocar los mismos daños que la falta de una proteína, por otra parte, que se presente un exceso de proteína puede provocar problemas como la aparición de trastornos digestivos o menor consumo de pienso (De Blas y González-Mateos, 2020).

Las necesidades de los tres aminoácidos esenciales, lisina, metionina y treonina, han sido actualizados recientemente por Marín-García et al. (2020a), pero las necesidades de la arginina aún no se han revisado, ya que desde hace aproximadamente más de 40 años no se ha realizado alguna actualización. Las recomendaciones van desde 0.8% de arginina (Adamson y Fisher, 1976) a 1.23% de arginina (McWard et al., 1967).

Tras el estudio realizado por Sancho et al. (2021), se estableció que valores contenido de arginina en pienso de 10 g/kg MS permitían que los gazapos de alta velocidad de crecimiento tuvieran un correcto crecimiento.

2 Objetivo

El objetivo principal de este trabajo fin de máster fue determinar el nivel adecuado de arginina para maximizar el crecimiento durante el engorde en conejos de diferentes líneas seleccionadas por su velocidad de crecimiento a partir su balance proteico.

3 Material y métodos

Los experimentos de este trabajo están contemplados dentro del proyecto del Plan Nacional “Mejora genética del conejo de carne: nuevas estrategias para mejorar la respuesta genética, la eficiencia alimentaria, reproducción y salud de líneas paternas” (AGL2017-85162-C2-1-R). Todos sus procedimientos de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia (código de autorización 2018/VSC/PEA/0116) y fueron llevados a cabo siguiendo las recomendaciones del European Group on Rabbit Nutrition (Fernández-Carmona et al., 2005) y el Real Decreto 53/2013 para la protección de los animales de experimentación (Boletín Oficial del Estado, 2013).

3.1 Dietas experimentales

Al empezar el trabajo se formularon y fabricaron 5 piensos experimentales isonutritivos, con los niveles de aminoácidos azufrados, lisina, y treonina revisados recientemente para animales de alta GMD (Marín-García et al., 2020a), que solo se diferenciaban en el contenido de arginina.

Se realizó una mezcla basal común para los 5 piensos, que incluía L-arginina sintética hasta alcanzar un contenido de arginina de 5 g/kg, calculado a partir del análisis de una micromezcla constituida por las materias primas que aportan arginina (cebada, gluten meal, salvado de trigo, heno de alfalfa, pulpa de remolacha y concentrado fibroso) en las proporciones indicadas y la proporción de L-arginina industrial incluida.

Los ingredientes y la composición química teórica de esta mezcla basal se muestran en la Tabla 1. A esta mezcla basal con un nivel inicial de 5 g/kg de arginina (con el que se fabricó el pienso P1) se añadió L-arginina sintética en diferentes proporciones hasta obtener teóricamente 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 g/kg del aminoácido para los piensos P2, P3, P4 y P5 respectivamente. Los valores finales determinados de arginina de los piensos fueron 6.5, 9.6, 11.1, 13.2 y 14.9 g/kg, para los piensos P1, P2, P3, P4 y P5, respectivamente Tabla 2.

Los piensos fueron fabricados como pellets en la planta piloto de fabricación de piensos de la UPV.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de la mezcla basal.

| Ingredientes | % | Composición química teórica | g/kg MS |
|--------------------------|-------|---|---------|
| Cebada | 19.5 | Materia seca ^b | 902 |
| Gluten meal | 9.0 | Energía digestible (MJ/kg) ^b | 10.0 |
| Salvado trigo | 17.4 | Proteína bruta ^b | 169 |
| Heno alfalfa | 35.0 | Proteína digestible ^b | 120 |
| Pulpa remolacha | 11.7 | Lisina ^c | 8.40 |
| Arbocel® | 3.0 | Metionina ^c | 4.16 |
| Aceite soja | 1.0 | Cistina ^c | 2.64 |
| L-lisina | 0.541 | Metionina+Cistina ^c | 6.80 |
| DL-metionina | 0.216 | Treonina ^c | 6.02 |
| L-treonina | 0.177 | Triptófano ^c | 2.30 |
| L-triptófano | 0.100 | Isoleucina ^c | 5.30 |
| L-histidina | 0.107 | Valina ^c | 6.60 |
| L-arginina | 0.036 | Histidina ^c | 3.36 |
| Carbonato cálcico | 0.073 | Arginina ^c | 5.00 |
| Fosfato bicálcico | 1.326 | Fibra neutro detergente ^b | 332 |
| Cloruro sódico | 0.404 | Fibra ácido detergente ^b | 197 |
| Corrector vitam. y olig. | 0.500 | Lignina ácido detergente ^b | 47 |
| | | Almidón ^b | 151 |
| | | Extracto etéreo ^b | 27.9 |

^a Suministrado por kg de pienso: Vitamina A: 8.375 IU; Vitamina D3: 750 IU; Vitamina E: 20 mg; Vitamina K3: 1 mg; Vitamina B1: 1 mg; Vitamina B2: 2 mg; Vitamina B6: 1 mg; Ácido nicotínico: 20 mg; Cloruro de colina: 250 mg; Magnesio: 290 mg; Manganeso: 20 mg; Zinc: 60 mg; Yodo: 1.25 mg; Hierro: 26 mg; Cobre: 10 mg; Cobalto: 0.7; Mezcla de butilhidroxilanilola y etoxiquinina: 4 mg; Diclazuril: 1 mg.

^b Calculados según FEDNA (2019).

^c Calculados a partir del análisis de una micromezcla (5 kg) proporcional de las materias primas (cebada, gluten meal, salvado trigo, heno alfalfa, pulpa remolacha, concentrado fibroso y aceite de soja) y de la proporción y riqueza de los aminoácidos industriales añadidos.

Tabla 2. Composición química de los piensos experimentales (g/kg MS).

| Composición | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|
| Materia seca | 884 | 886 | 885 | 886 | 887 |
| Cenizas | 76.9 | 77.4 | 78.4 | 73.5 | 74.7 |
| Proteína bruta | 184 | 188 | 189 | 193 | 199 |
| Extracto etéreo | 31.7 | 30.9 | 28.0 | 28.8 | 28.4 |
| Fibra neutro detergente | 384 | 387 | 388 | 387 | 383 |
| Fibra ácido detergente | 210 | 210 | 209 | 211 | 209 |
| Lignina ácido detergente | 31.1 | 32.0 | 31.3 | 31.4 | 30.4 |
| Almidón | 179 | 174 | 184 | 177 | 176 |
| Lisina | 8.4 | 8.5 | 8.5 | 8.5 | 8.4 |
| Metionina | 4.5 | 4.4 | 4.2 | 4.4 | 4.6 |
| Cistina | 2.5 | 2.7 | 2.4 | 2.5 | 2.4 |
| Metionina+Cistina | 7.0 | 7.2 | 6.6 | 6.8 | 7.0 |
| Treonina | 7.2 | 7.3 | 7.7 | 7.7 | 7.4 |
| Isoleucina | 5.5 | 5.4 | 5.4 | 5.6 | 5.3 |
| Valina | 7.6 | 7.5 | 7.3 | 7.8 | 7.5 |
| Histidina | 3.5 | 3.7 | 4.0 | 3.6 | 3.5 |
| Arginina | 6.5 | 9.6 | 11.1 | 13.2 | 14.9 |

3.2 Animales y procesado de muestras

En este trabajo se utilizaron parte de los animales utilizados en un trabajo fin de master previo donde se controló el efecto de los piensos sobre los parámetros productivos (Sancho, 2021). El número de animales fueron 173 animales en cuatro tandas diferentes de sacrificio. Los animales se seleccionaron de dos líneas genéticas descritas previamente, la línea paternal RLP y la línea maternal LP.

Para este trabajo se analizaron los cuerpos vacíos de 123 animales, procedentes de los animales iniciales y las primeras dos tandas, de los cuales corresponde a 20 animales de 28 días de edad y 103 de 63 días.

La prueba de engorde se realizó en 2021, mientras tanto las canales se guardaron congeladas a -20°C para su posterior análisis. Tras el sacrificio mediante punción intracardiaca con tiopental sódico (75 mg/kg PV), los animales fueron rasurados parcialmente para facilitar la homogeneidad final de la muestra a analizar, pero controlando el peso de pelo rasurado y guardando una muestra representativa para corregir su aporte proporcional.

En primer lugar, las canales congeladas se cortaron en varias secciones y trocearon en tacos con una máquina de corte de cinta para carne (Figura 2). A continuación, se realizó el triturado con una trituradora tipo "cutter" comercial (Figura 3). Al final de este proceso se obtuvo una masa homogénea de la cual se recogieron en cuatro placas Petri de cada animal para su posterior congelado a -20°C y liofilizado (Figura 4).

Una vez liofilizada la muestra se procedió a su molido, en este caso se usa un molino con un tamiz de 1 mm (Figura 5), suficiente para que la muestra sea homogénea para su posterior análisis químico.



Figura 2. Corte de cinta.



Figura 3. Trituradora tipo "Cutter"



Figura 4. Liofilizado



Figura 5. Molino con tamiz 1 mm.

3.3 Análisis químico

Se recogieron muestras de los piensos y se analizaron siguiendo los procedimientos de AOAC (2002) para determinar materia seca (MS; 934.01) y proteína bruta (PB; 990.03).

Las muestras de cuerpo vacío fresco fueron analizadas para determinar su contenido en materia seca (MS; 934.01) y se analizaron siguiendo los procedimientos de AOAC (2002). Las muestras liofilizadas fueron analizadas para determinar su contenido en materia seca (MS; 934.01), cenizas (Ce; 942.05) y proteína bruta (PB; 990.03).

3.4 Cálculos y análisis estadístico

Los datos obtenidos de los cuerpos vacíos fueron inicialmente caracterizados mediante un análisis descriptivo (PROC MEANS) de SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 2009).

A partir de los datos obtenidos de MS y PB de las canales y pelo de los animales de 28, se determinó la relación entre el peso vivo de los cuerpos enteros vacíos a los 28 días y el contenido en proteína de los animales a los 28 días, mediante un procedimiento PROC REG de SAS (2009).

Los datos del crecimiento y balance proteico de los animales fueron analizados mediante el procedimiento GML del programa estadístico SAS (Statistical Analysis Systems Institute), según un modelo en el que se consideraron el pienso (5 niveles), la línea genética (2 niveles) y su interacción.

4 Resultados

En la Tabla 3 se muestra los valores de media, máximos y mínimos, con su desviación estándar y el coeficiente de variación, de los datos obtenidos para los animales sacrificados a los 28 días de edad, donde la dieta no tiene importancia ya que son los valores iniciales. Estos datos son fundamentales para estimar el contenido proteico inicial de los animales, por lo que es muy importante disponer de una adecuada variabilidad animal, como así fue. Los animales mostraron un peso a los 28 días que varió entre los 374 y 936 g de peso vivo (PV), similar a los obtenidos en trabajos previos de balance corporal (Marín-García et al., 2020a).

A partir de dichos datos, en la Figura 6 se representa el contenido en proteína del cuerpo vacío a los 28 días (kg) en función del peso vivo a los 28 días (kg), de la cual obtenemos una ecuación de predicción bastante precisa ($R^2=0.9634$) que se usará para poder predecir el contenido inicial de la proteína a los 28 días de vida de los animales sacrificados a los 63 días de edad.

Por otra parte, en la Figura 7 hemos obtenido la misma recta, pero en este caso se separa por línea genética para valorar posibles diferencias asociadas al tipo genético. Dado que son rectas con coeficientes muy parecidos, para la predicción se utilizará la recta sin diferenciación de línea genética.

Tabla 3. Composición química del cuerpo vacío a los 28 días.

| | PV (kg) | PCV (kg) | MS (%) | PB (%) |
|--------------|---------|----------|--------|--------|
| Media | 0.659 | 0.536 | 27.85 | 58.39 |
| min. | 0.374 | 0.302 | 24.72 | 48.62 |
| máx. | 0.936 | 0.765 | 32.62 | 62.57 |
| DE | 0.148 | 0.126 | 1.78 | 3.259 |
| CV | 22.54 | 23.57 | 6.38 | 5.58 |

PV (peso vivo), PCV (peso cuerpo vacío), CV (coeficiente de variación), D.E. (desviación estándar).

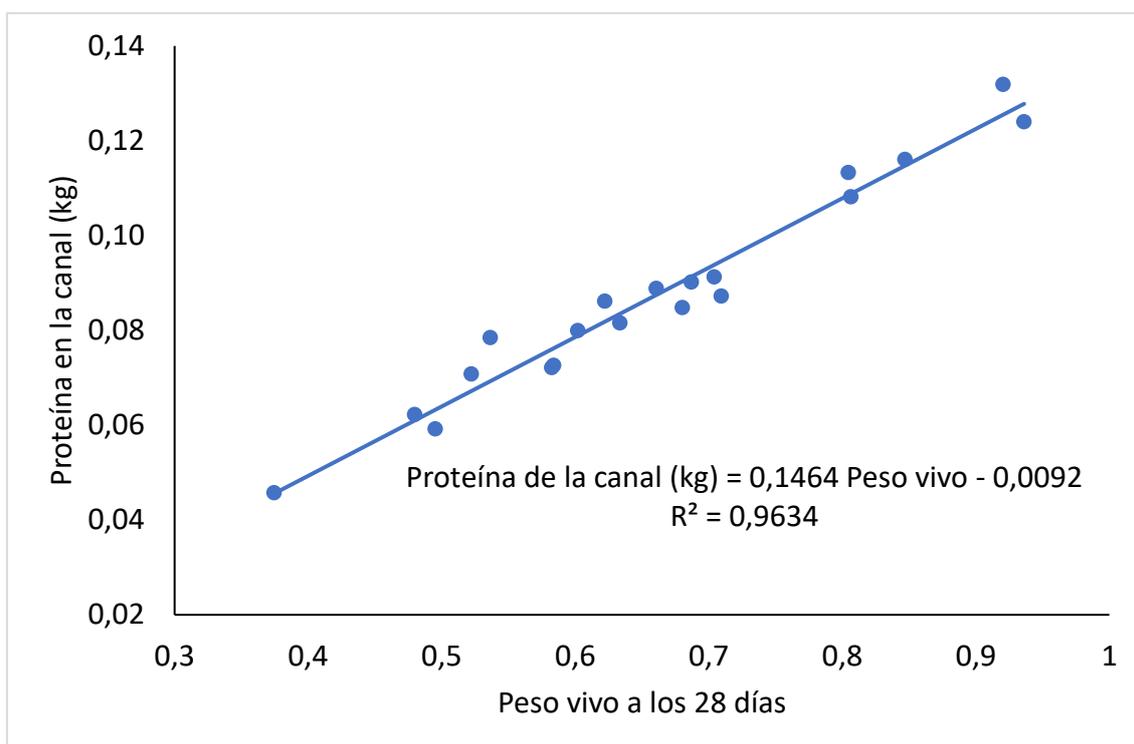


Figura 6. Recta regresión entre el peso vivo y el contenido en proteína del cuerpo vacío a los 28 días.

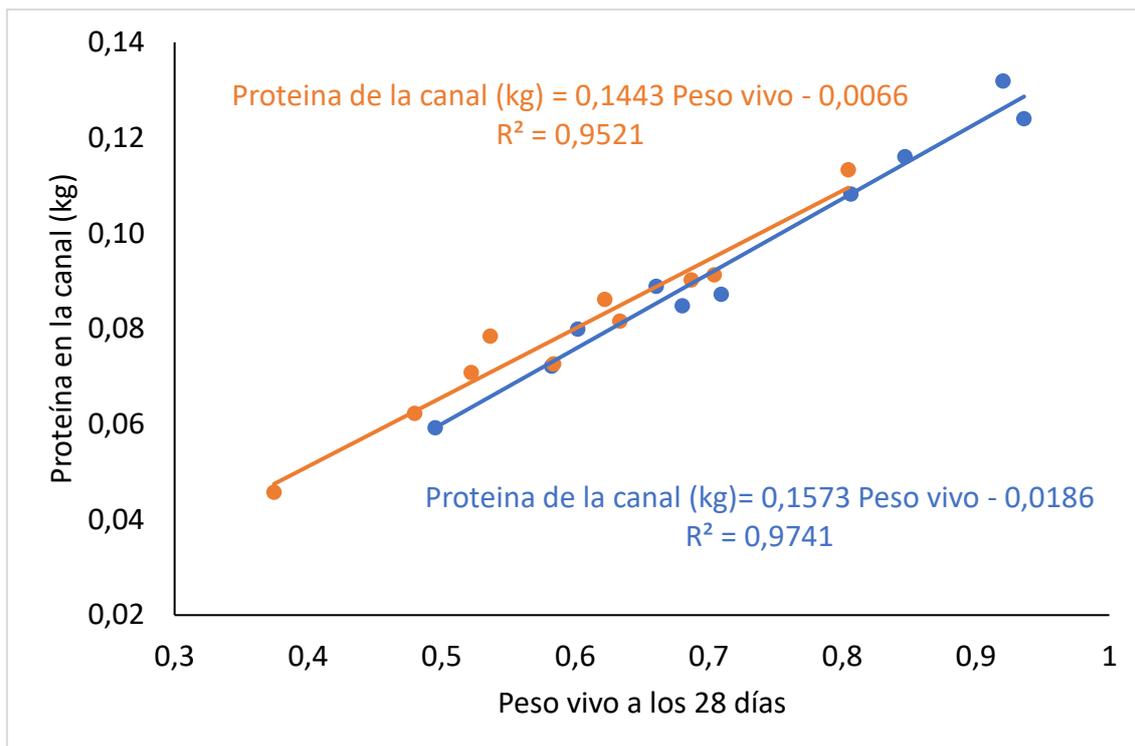


Figura 7. Rectas regresión entre el peso vivo y el contenido en proteína del cuerpo vacío a los 28 días en función de la línea genética (RLP en azul y LP en naranja).

Para poder observar el efecto del nivel de arginina del pienso y la genética sobre el balance proteico de los conejos en el engorde, se analizaron los valores de los animales que llegaron vivos y sanos a los 63 días de vida (fin del engorde), un total de 103 animales.

En la Tabla 4 se muestra los valores de la composición química de los animales a los 63 días de edad, lo que se pretende ver con estos datos es tener una visión general para valora si hay un buen crecimiento en comparación de los animales iniciales. El peso medio a los 63 días fue el esperado (sobre los 2300 g) presentando un buena variabilidad asociada (20%), probablemente al tipo genético, pero también quizás al tipo de pienso. Estos valores son similares a los obtenidos para estas líneas y edades en trabajos previos (García-Quirós et al., 2014; Peixoto-Gonçalves et al., 2023b). También se observan que existió una variabilidad en el contenido proteico de los cuerpos vacíos (10%), objeto de este estudio.

Tabla 4. Pesos y composición química a los 63 días de vida.

| | PV (kg) | PCV (kg) | MS (%) | PB (%) |
|--------------|---------|----------|--------|--------|
| Media | 2.296 | 1.697 | 29.776 | 63.181 |
| min | 1.642 | 1.150 | 25.897 | 51.157 |
| max | 3.337 | 2.499 | 35.616 | 73.811 |
| D.E. | 0.467 | 0.351 | 2.225 | 6.253 |
| CV | 20.352 | 20.685 | 7.471 | 9.897 |

PV (peso vivo), PCV (peso cuerpo vacío), CV (coeficiente de variación), D.E. (desviación estándar), MS (materia seca), PB (proteína bruta).

En la Tabla 5 se muestra el efecto que tuvieron el nivel de arginina y el tipo genético sobre los principales parámetros de crecimiento de los animales utilizados en este trabajo. Como era de esperar, y se ha observado en trabajos previos (García-Quirós et al., 2014), los animales de la línea paternal RLP fueron significativamente más grandes al destete y comieron más durante el engorde, por lo que mostraron una mayor ganancia de peso y peso final a los 63 días de vida que los animales de la línea LP. Respecto al nivel de arginina del pienso, cuando subimos de 6.5 a 9.6 g de arginina/kg MS (P1 vs P2) observamos un aumento significativo de la ingestión, de la GMD y del peso final a los 63 días de vida (+24 g MS/d, + 5 g/d y +228 g, respetivamente; $P<0.05$). A partir de dicho nivel de arginina, una suplementación superior no llevó a una mejora de los parámetros de crecimiento de los conejos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sancho (2021) con estos mismos piensos y con un mayor número de animales, donde concluye que el nivel mínimo de arginina que cubre completamente las necesidades de los conejos de alta velocidad de crecimiento es de 9.6 g/kg MS, que coinciden con las actuales recomendaciones (De Blas y Mateos, 2020).

Tabla 5. Efecto de los piensos experimentales y de las líneas genéticas en parámetros de crecimiento.

| | PIENSO | | | | | GENETICA | | | P-VALOR | |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------|-------|-------|---------|----------|
| | P1 (n=24) | P2 (n=16) | P3 (n=23) | P4 (n=20) | P5 (n=20) | LP | RLP | SEM | Pienso | Genética |
| Peso a los 28 d (kg) | 0.613 | 0.689 | 0.642 | 0.643 | 0.608 | 0.530 | 0.749 | 0.018 | 0.3569 | <0.0001 |
| Ingestión de pienso (g MS/d) | 112.5 ^a | 136.1 ^c | 127.1 ^b | 130.7 ^b | 119.8 ^{ab} | 104.4 | 146.0 | 2.5 | 0.0004 | <0.0001 |
| Ganancia de peso (g/d) | 46.18 ^a | 51.20 ^c | 49.92 ^b | 50.90 ^b | 47.60 ^{ab} | 40.90 | 57.42 | 0.74 | 0.0073 | <0.0001 |
| Peso a los 63 d (kg) | 2.252 ^a | 2.480 ^b | 2.398 ^b | 2.455 ^b | 2.288 ^a | 1.977 | 2.772 | 0.036 | 0.0166 | <0.0001 |

a.b Medias dentro de tratamiento no compartiendo superíndice son significativamente diferente a $P<0.05$.

* Interacción pienso x genética ($P<0.05$).

En el caso de la ingestión de pienso se observa una interacción entre el nivel de arginina del pienso y el tipo genético ($P=0.0357$). La ingestión de los animales de la línea LP aumentó hasta los 9.6 g/kg MS, manteniéndose más o menos constante a partir de dicho momento. Sin embargo, en el caso de los animales de la línea RLP aunque la ingestión también se maximizó con 9.6 g de arginina/kg MS a partir de dicho momento una mayor adición de arginina redujo significativamente la ingestión hasta alcanzar los valores del pienso con 6.5 g/kg MS. Este mismo patrón también se observó para la ingestión de PD aunque no llegó a ser significativa ($P=0.0574$).

En la Tabla 6 podemos ver los datos obtenidos durante el sacrificio y el balance proteico de los animales. Respecto al efecto del tipo genético, los animales de la línea paternal RLP, aunque mostraron una mayor ingestión y retención diaria de proteína (+39 y +26%, respectivamente; $P<0.001$), la eficacia de retención de esta fue menor (-0.06; $P<0.001$) por lo que su contenido de proteína corporal fue menor (-10.3 puntos porcentuales; $P<0.001$). En algún trabajo anterior con líneas paternas Marín-García et al. (2020a) ya

se observa que los animales con una elevada velocidad de crecimiento tienen una menor retención de proteína (a costa de una mayor retención de grasa), que podría ser indicativo de que los piensos actuales para conejos comerciales no cubrirían completamente las necesidades de proteína de este tipo de animales, siendo necesarios trabajos como el actual para corregir dichas desviaciones.

Tabla 6. Efecto de los piensos experimentales y de las líneas genéticas en el balance proteico.

| | PIENSO | | | | | GENETICA | | | P-VALOR | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|-------|------|---------|----------|
| | P1 (n=24) | P2 (n=16) | P3 (n=23) | P4 (n=20) | P5 (n=20) | LP | RLP | SEM | Pienso | Genética |
| Composición del cuerpo vacío: | | | | | | | | | | |
| Materia seca (%) | 29.53 | 30.12 | 30.37 | 30.50 | 29.69 | 28.64 | 31.45 | 0.25 | 0.3019 | <0.0001 |
| Proteína (%) | 63.50 | 60.92 | 61.49 | 61.65 | 63.34 | 67.33 | 57.03 | 0.51 | 0.0926 | <0.0001 |
| Ingestión de proteína (g/d) | 15.08 ^a | 18.51 ^b | 17.41 ^b | 18.56 ^b | 17.36 ^b | 14.52 | 20.25 | 0.35 | <0.0001 | <0.0001 |
| Retención de proteína (g/d) | 9.48 ^a | 10.25 ^b | 9.88 ^{ab} | 10.40 ^b | 9.80 ^{ab} | 8.82 | 11.11 | 0.16 | 0.0613 | <0.0001 |
| Eficacia de retención de la proteína | 0.640 ^b | 0.573 ^a | 0.584 ^a | 0.567 ^a | 0.568 ^a | 0.617 | 0.556 | 0.10 | 0.0031 | <0.0001 |

a.b Medias dentro de tratamiento no compartiendo superíndice son significativamente diferente a P<0.05.

En lo que corresponde al efecto del nivel de arginina sobre la retención de proteína en los animales, podemos ver que el pienso P2 (con 9,6 g de arginina/kg MS) consigue maximizar la ingestión de PD, no viéndose mejorada por un mayor aporte de arginina. De esa forma, al igual que ocurría con la GMD, la retención de proteína en el cuerpo vacío de los conejos alcanza su máximo con el pienso P2, manteniéndose con niveles adicionales de arginina (Figura 8). Estos resultados confirmarían las actuales recomendaciones de arginina para los conejos (De Blas y Mateos, 2020; Sancho, 2021), ya que con cerca de 10 g/kg MS ya conseguimos alcanzar el máximo crecimiento y retención de proteína de estos animales.

Sin embargo, observamos que un aumento del nivel de arginina reduce la eficacia de retención de proteína en los animales (de forma ligera pero continuada en los animales de la línea LP y de forma más brusca en los RLP; Figura 8). Esto podría estar relacionado con una interacción que la arginina pueda estar teniendo con otro u otros aminoácidos. Ya D'Mello y Lewis (1970) describen que esta interacción de la arginina con otros aminoácidos a nivel ileal depende principalmente de la presencia de transportadores específicos en la mucosa ileal. Estos transportadores permiten que los aminoácidos se absorban de manera selectiva y facilitan su intercambio con otros aminoácidos.

En condiciones normales, la arginina puede interactuar con otros aminoácidos a nivel ileal en varias formas (D'Mello y Lewis, 1970; D'Mello, 2003). Algunas interacciones comunes incluyen el intercambio con lisina. La arginina y la lisina son aminoácidos con estructuras químicas similares y son transportados por los mismos transportadores en la mucosa ileal. Esto facilita su intercambio a nivel ileal, lo que significa que la presencia de lisina puede promover la absorción de arginina y viceversa. Algunos aminoácidos pueden competir por los mismos transportadores en la mucosa ileal. Esto significa que, si existe una mayor concentración de un aminoácido específico en el intestino, puede haber una disminución en la absorción de arginina y viceversa. Por ejemplo, se ha observado que la presencia de grandes cantidades de aminoácidos de cadena ramificada, como la leucina y la valina, pueden disminuir la absorción de arginina a nivel ileal. Algunos estudios han sugerido que la absorción de arginina puede ser mejorada por la presencia de ciertos aminoácidos, como la glutamina y la histidina. Se ha demostrado que la glutamina puede aumentar la expresión de los transportadores de aminoácidos en la mucosa intestinal, lo que facilita la absorción de arginina y otros aminoácidos.

Esto nos podría estar indicando que deberíamos explorar estas interacciones con otros aminoácidos para mejorar todavía más el rendimiento de nuestros animales. Esto es complicado, ya que requiere evaluar un elevado número de combinaciones de niveles de aminoácidos, pero disponemos de métodos, como el basado en la utilización del nitrógeno ureico en plasma propuesto por Marín-García et al. (2020b), que nos permite evaluar fácil y eficazmente en un elevado número de dietas la combinación de aminoácidos más adecuada.

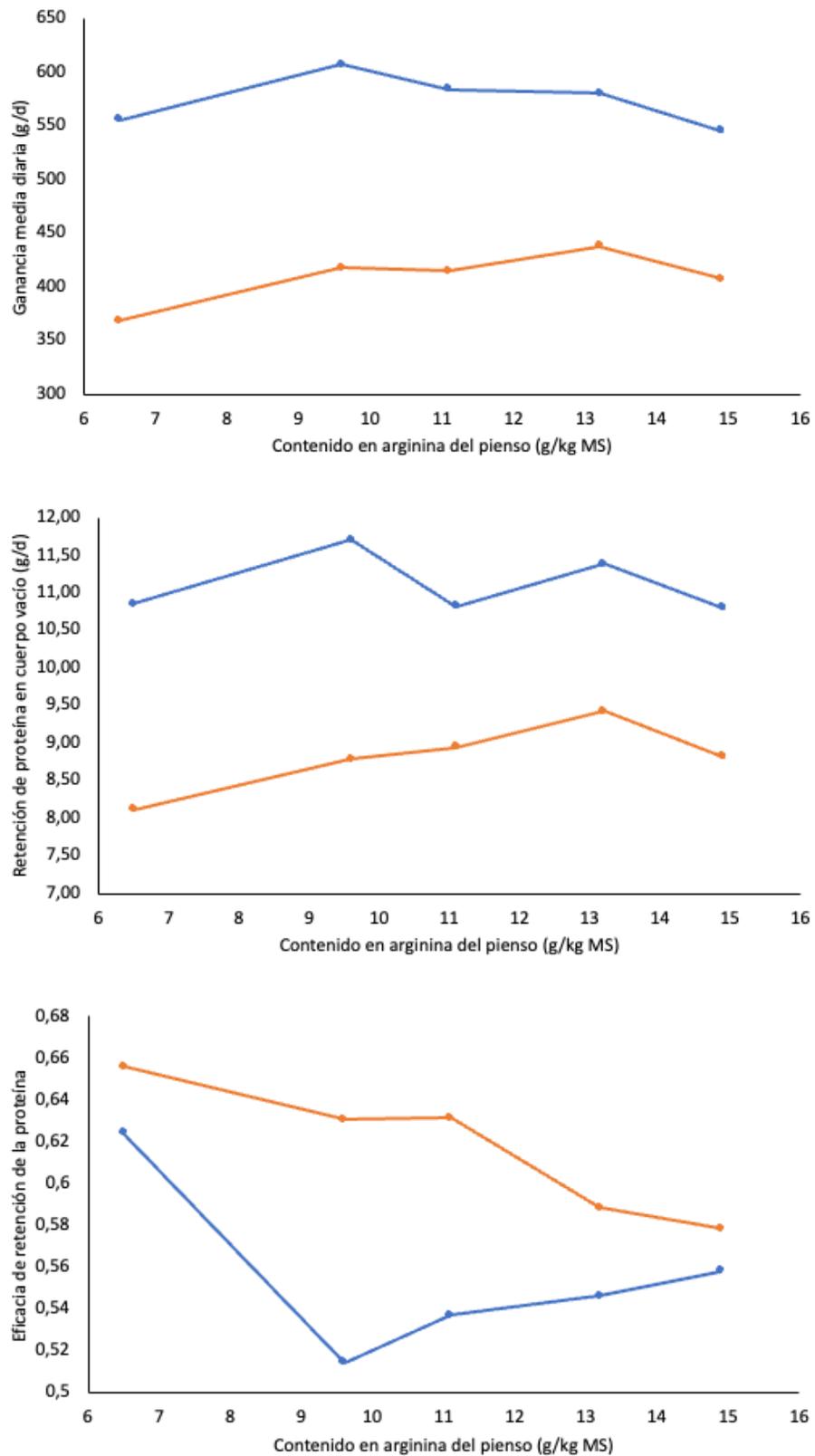


Figura 8. Evolución de la ganancia media diaria, retención de proteína y eficacia de retención de la proteína en los animales de las líneas LP (naranja) y RLP (azul) con el nivel de arginina del pienso.

5 Conclusiones

Finalmente podemos llegar a varias conclusiones

- 1) El nivel de arginina afecta a la cantidad de proteína retenida de la canal según la línea genética. Las actuales recomendaciones de 10 g de arginina/kg MS nos permite maximizar dicha retención de proteína y la ganancia media diaria de los conejos de engorde.
- 2) Parecen existir posibles interacciones de la arginina con otros aminoácidos, que podrían estar afectando a la eficacia de retención de la proteína, que merecería investigarse en un futuro.

6 Bibliografía

ADAMSON, I.; FISHER, H., 1976. Further studies on the arginine requirements of the rabbit. *J. Nutr.*, 106: 717-723.

ARNAU-BONACHERA, A.; CERVERA, C.; BLAS, E.; LARSEN, T.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; RÓDENAS, L.; PASCUAL, J.J., 2018. Long-term implications of feed energy source in different genetic types of reproductive rabbit females: I. Resource acquisition and allocation. *Animal*, 12(9): 1867-1876.

AOAC. 2002. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th Ed. AOAC International. Gaithersburg (USA).

BASELGA, M.; BLASCO, A., 1989. *Mejora genética del conejo de producción de carne*. Ed. MundiPrensa. Madrid. 110 pp.

BASELGA, M., 2004. Genetic improvement of meat of rabbits. *Proc of the 8th World Rabbit Congress*. Ed. World Rabbit Science Association. Puebla, Mexico, 1: 57-62.

BLASCO, A.; PILES, M.; VARONA, L., 2003. A Bayesian analysis of the effect of selection for growth rate on growth curves in rabbits. *Genet. Sel. Evol.*, 35: 21-41.

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO, 2013. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. «BOE» núm. 34, de 8 de febrero de 2013, 11370 a 11421.

BONATO, M.A.; SAKOMURA, N.K.; SILVA, E.P.; ARAÚJO, J.A.; SÜNDER, A.; LIEBERT, F., 2015. Amino acid requirements for pullets based on potential protein deposition and the efficiency of amino acid utilization. *Nutritional Modelling for Pig and Poultry*. Ed. CAB International Wallingford (UK). 1: 269-282.

CARTUCHE, L.; PASCUAL, M.; GÓMEZ, E. A.; BLASCO, A., 2014. Economic weights in rabbit meat production. *World Rabbit Sci.*, 22: 165-177.

COLIN, M., 1975. Effet de la teneur en arginine du régime sur la croissance et le bilan azoté chez le lapin: relation avec le taux de lisine. *Ann. Zootech.*, 24: 629-638.

D'MELLO, J.P.F., 2003. Adverse effects of amino acids, in: *Amino Acids in Animal Nutrition*. 2nd Ed. CAB International, Wallingford (UK), 125-142.

D'MELLO, J.P.F.; LEWIS D., 1971. Amino acid interactions in chick nutrition. *Br. Poult. Sci.*, 12(3):345-358.

DE BLAS, J.C.; GONZALEZ-MATEOS, G., 2020. Feed Formulation. *Nutrition of the Rabbit*. 3th Ed. CAB International. Wallingford (UK), 246-249.

DELLA BADIA, A., 2019. Ajuste de la relación proteína/energía del pienso en conejos de engorde seleccionados por alta velocidad de crecimiento. *Trabajo final de grado*. Universitat Politècnica de València.

ESTANY, J.; CAMACHO, J.; BASELGA, M.; BLASCO, A., 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genet. Sel. Evol.*, 24: 527-537.

FEDNA, 2019. *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (4ª edición)*. Ed: C. de Blas, P. García-Rebollar, M.

Gorrachategui y G.G. Mateos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Noviembre, 2019. Madrid. 604 pp.

FERNÁNDEZ-CARMONA J.; BLAS E.; PASCUAL J.J.; MAERTENS L.; GIDENNE T.; GARCÍA J., 2005. Recommendations and guidelines for applied nutrition experiments in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 13: 209–228.

FERRIAN, S.; GUERRERO, I.; BLAS, E.; GARCÍA-DIEGO, F.J.; VIANA, D.; PASCUAL, J.J.; CORPA, J.M., 2012. How selection for reproduction or foundation for longevity could have affected blood lymphocyte populations of rabbit does under conventional and heat stress conditions. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 150(1-2): 53-60.

FERRIAN, S.; BLAS, E.; LARSEN, T.; SÁNCHEZ, J.P.; FRIGGENS, N.C.; CORPA, J.M.; BASELGA, M.; PASCUAL, J.J., 2013. Comparison of immune response to lipopolysaccharide of rabbit does selected for litter size at weaning or founded for reproductive longevity. *Res. Vet. Sci.*, 94(3): 518-525.

GAMAN, E.; FISHER, H., 1970. The essentiality of arginine, lysine and methionine for the growing rabbit. *Nutr. Rep. Int.*, 1: 57-64.

GARCÍA-QUIRÓS, A.; ARNAU-BONACHERA, A.; PENADÉS, M.; CERVERA, C.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; RÓDENAS, L.; SELVA, L.; VIANA, D.; CORPA, J.M.; PASCUAL, J.J., 2014. A robust rabbit line increases leucocyte counts at weaning and reduces mortality by digestive disorder during fattening. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 161 (3–4): 123-131.

MARÍN-GARCÍA, P.J.; RÓDENAS, L.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; BLAS., E.; PASCUAL, J.J., 2020a. A moderate protein diet does not cover the requirements of growing rabbits with high growth rate. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 264: 114495.

MARÍN-GARCÍA, P. J.; LÓPEZ-LUJÁN, M. C.; RÓDENAS, L.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; BLAS, E.; PASCUAL, J.J., 2020b. Plasma urea nitrogen as an indicator of amino acid imbalance in rabbit diets. *World Rabbit Sci.*, 28(2): 63–72.

MCWARD, G.W.; NICHOLSON, L.B.; POULTON, B.R., 1967. Arginine requirements of the young rabbit. *J. Nutr.*, 92: 118-120.

PAYÁ, A.; PAYÁ, J.; PONTES, M., 1978. Requerimientos nutritivos del conejo. Proc of the *III Symposium Cunicultura*, 13-15.

PEIXOTO-GONÇALVES, C.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; RÓDENAS, L.; LARSEN, T.; CORPA, J.M.; BLAS, E.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; PASCUAL, J.J., 2023a. Reproductive performance of rabbit females from three paternal lines with a different potential for growth rate and resilience. *Animal*, 17: 100729.

PEIXOTO-GONÇALVES, C.; MARTÍNEZ-PAREDES, E.; RÓDENAS, L.; CORPA, J.M.; BLAS, E.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; PASCUAL, J.J., 2023b. Growth performance of three paternal rabbit lines with a different potential for growth rate and resilience. *World Rabbit Sci.*, 31: in press.

RAGAB, M.; SANCHEZ, J.P.; BASELGA, M., 2015. Effective population size and inbreeding depression on litter size in rabbits. *J. Anim. Breed. Genet.*, 132: 68-73.

SANCHO, F.J., 2021. Efecto del contenido en arginina del pienso sobre la digestibilidad y el rendimiento productivo en cebo de dos líneas genéticas de conejos. *Trabajo fin de máster*. Universitat Politècnica de València.

SAVIETTO, D.; FRIGGENS, N.C.; PASCUAL, J.J., 2015. Reproductive robustness differs between generalist and specialist maternal rabbit lines: the role of acquisition and allocation of resources. *Genet. Sel. Evol.*, 47: 1-11.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. 2009. Release 9.2 User's guide. 2nd edition. *SAS Institute Inc. Cary (USA)*.

THEILGAARD, P.; BASELGA, M.; BLAS, E.; CERVERA, C.; PASCUAL, J.J., 2009. Differences in productive robustness in rabbits selected for reproductive longevity or litter size. *Animal*, 3: 637-646.

VAN MILGEN, J.; DOURMAD, J.Y., 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 6: 15.