

TREBALL DE FI DE GRAU

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER A L'ESTIMACIÓ DE LA DIGESTIBILITAT *IN* *VITRO* PER AUS

TUTORA PROFESSIONAL : Anna M. Pérez Vendrell
Institut de Recerca de Tecnologies Agroalimentàries

TUTOR ACADÈMIC: F. Xavier Rius Ferrús
Universitat Rovira i Virgili

AUTOR: Ferran Llauradó Español



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, juny del 2019

Agraïments:

Aquest treball és l'inici d'un projecte de desenvolupament de tècniques *in vitro* per la digestibilitat d'aus del departament de Nutrició Animal de l'IRTA.

Voldria agrair la confiança depositada per la directora de l'estudi i tutora professional d'aquest treball, Anna M. Pérez Vendrell que m'ha aconsellat, ajudat i guiat en tot moment necessari.

També, voldria donar les gràcies a l'equip del laboratori de Nutrició Animal, per l'ajuda prestada i el bon ambient de treball que he tingut durant la meva estada al laboratori. En especial, voldria donar les gràcies a Cristina Pérez per coordinar-me amb la resta de laboratori i proveir-me dels recursos necessaris.

Finalment, m'agradaria agrair els consells i suport del tutor acadèmic, F. Xavier Rius Ferrús, que m'ha ajudat a desenvolupar aquest treball de la millor manera possible.

ÍNDEX

1. RESUM	5
2. OBJECTIUS	6
3. INTRODUCCIÓ	7
3.1 ÀMBIT DE TREBALL	7
3.2 FONAMENTS	7
3.2.1 ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS DE LA TÈCNICA IN VITRO	8
3.2.2 NOVA ADAPTACIÓ DE LA TÈCNICA IN VITRO ANKOM-YEGANI	9
4. PART EXPERIMENTAL	10
4.1 MOSTREIG	10
4.2 MÈTODES DESENVOLUPATS EN LA DETERMINACIÓ	11
4.2.1 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA BRUTA SEGONS EL MÈTODE DUMAS	12
4.2.2 DETERMINACIÓ DE MATÈRIA SECA	13
4.2.3 DETERMINACIÓ DE CENDRES	14
4.2.4 DETERMINACIÓ DE MIDÓ, KIT MEGAZYME	15
4.2.5 DETERMINACIÓ DE L'ENERGIA BRUTA CALORIMETRIA ADIABÀTICA	18
4.2.6 DETERMINACIÓ DE LA FIBRA BRUTA	19
4.3 TRACTAMENTS IN VITRO	21
4.3.1 DETERMINACIÓ IN VITRO DE LA DIGESTIBILITAT ANKOM YEGANI	22
4.4 DETERMINACIONS DE LA DIGESTIBILITAT IN VITRO	25
4.4.1 ADAPTACIONS	25
4.4.2 CÀLCULS DE LA DIGESTIBILITAT	25
5. DISCUSSIÓ DE RESULTATS	27
5.0 COMPOSICIÓ DE LES MOSTRES	27
5.1 DIGESTIBILITAT DE LA MATÈRIA SECA	28
5.2 DIGESTIBILITAT DE LA PROTEÏNA BRUTA	30
5.3 DIGESTIBILITAT DEL MIDÓ	32
5.4 DIGESTIBILITAT DE LA MATÈRIA ORGÀNICA	33
5.5 COMPARATIVA ENTRE LA DIGESTIBILITAT DE MATÈRIA SECA I PROTEÏNA BRUTA	35
5.6 COMPARACIÓ DE LA DIGESTIBILITAT DE MATÈRIA SECA I PROTEÏNA BRUTA DELS PINSOS AMB VALORS <i>IN VIVO</i>	42
6. CONCLUSIONS	43
7. BIBLIOGRAFIA	45

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1 Valors de pH i mitjana del temps de retenció de l'aliment en diferents compartiments del sistema digestiu dels pollastres d'engerix ⁴	9
Taula 2 Mitjana de les fraccions nutritives de les mostres analitzades elaborada a partir de la base de dades de l'INRA.....	10
Taula 3 Classificació de les determinacions realitzades al laboratori	11
Taula 4 Reactius usats en la determinació del midó.....	17
Taula 5 Reactius usats en la determinació de la fibra bruta	20
Taula 6 Reactius utilitzats en la tècnica in vitro	24
Taula 7 Composició de les mostres estudiades.....	27
Taula 8 Comparativa de la digestibilitat de matèria seca obtinguts	28
Taula 9 Comparativa de la digestibilitat de la proteïna bruta.....	30
Taula 10 Comparativa de la digestibilitat del midó en matèries primeres	32
Taula 11 Comparativa de la digestibilitat de la matèria orgànica.....	33
Taula 12 Comparativa de la digestibilitat de matèria seca i de proteïna bruta dels pinsos amb els valors in vivo	42

ÍNDIX D'EQUACIONS

Equació 1: Equació per determinar el % de matèria orgànica	11
Equació 2: Equació per determinar el % de matèria seca	13
Equació 3: Equació per determinar el % de cendres.....	14
Equació 4: Equació per determinar el % de midó	16
Equació 5: Equació per determinar el % de fibra bruta	20
Equació 6: Equació per determinar la digestibilitat de matèria seca.....	25
Equació 7: Equació per determinar la digestibilitat de la proteïna bruta o del midó.....	26
Equació 8: Equació per determinar la digestibilitat de la matèria orgànica	26

ÍNDIX DE IL·LUSTRACIONS

Il·lustració 1 Discrepància de la digestibilitat de la matèria seca entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes.....	29
Il·lustració 2 Discrepància de la digestibilitat de la matèria seca entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos	29
Il·lustració 3 Discrepància de la digestibilitat de la proteïna bruta entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes.....	31
Il·lustració 4 Discrepància de la digestibilitat de la proteïna bruta entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos	31
Il·lustració 5 Discrepància de la digestibilitat del midó entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes	32
Il·lustració 6 Discrepància de la digestibilitat de la matèria orgànica entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes.....	34
Il·lustració 7 Discrepància de la digestibilitat de la matèria orgànica entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos	34
Il·lustració 8 Classificació en grups de les matèries primes del mètode Yegani per la digestibilitat de proteïna bruta i la digestibilitat de matèria seca	36
Il·lustració 9 Classificació de les matèries primes en el mètode IRTA	37
Il·lustració 10 Comparació de la repeticions de les matèries primes en el mètode IRTA.....	38
Il·lustració 11 Valors de la digestibilitat de les matèries primes en els dos mètodes.....	39
Il·lustració 12 Discrepàncies entre les digestibilitats de les 3 repeticions en pinsos en al mètode Yegani	40
Il·lustració 13 Discrepàncies en les digestibilitats de les 3 repeticions dels pinsos al mètode IRTA	41

RESUM

El coneixement dels valors de digestibilitat dels nutrients d'un animal són importants per predir la qualitat nutricional i la quantitat d'ingesta que es necessita per aconseguir una bona producció de l'animal d'interès. La determinació més exacte s'obté a partir de tècniques *in vivo* però aquestes tenen una gran despesa econòmica, consumeixen molt de temps i s'han reglat i reduït aquells mètodes que influeixen en el benestar animal.

Una de les tècniques desenvolupades per estimar la digestibilitat, són les tècniques *in vitro*, que són més econòmiques, ràpides i reproduïbles. En aquest treball s'ha desenvolupat una adaptació d'un mètode *in vitro* que permeti predir la digestibilitat aparent de les aus, específicament en pollastres d'engreix, en menys temps que el mètode Yegani¹ del qual s'ha fet la modificació.

S'han determinat la digestibilitat de la matèria prima, de la proteïna bruta, del midó i de la matèria orgànica pels dos mètodes. El mostreig correspon a 9 matèries primes: 4 cereals, 4 oleaginoses i la polpa de remolatxa; i 4 pinsos.

Els resultats finals han conclòs que el mètode Yegani obté una major digestibilitat de les composicions analitzades que el mètode IRTA. A més, tot i que el seu valor mig és similar els valors obtinguts per *in vivo*, s'obté una gran desviació de valors dins d'una mateixa tanda i una poca reproductibilitat entre les tandes.

ABSTRACT

To know the values of the digestibility of an animal's nutrients is important to predict the nutritional quality and the amount of intake that is needed to achieve a good production of the animal of interest. The most accurate determination is obtained from techniques *in vivo* but these have a high economic cost, high time-consuming and have been regulated and reduced those that influence animal welfare.

Some of the techniques developed to estimate digestibility are *in vitro* techniques, which are cheaper, faster and reproducible. In this work, an adaptation of an *in vitro* method has been developed that allows predicting the apparent digestibility of poultry, specifically in broilers, in less time than the Yegani method, of which the modification has been made.

They have been determined of the raw material, the raw protein, the starch and the organic matter by two methods. The sampling corresponds to a 9 raw materials: 4 cereals, 4 oilseeds and beetroot; and 4 feeds.

The final results conclude that the Yegani method obtains greater digestibility in these compositions than IRTA methods. But, although its average value is similar to the values obtained by *in vivo*, a great deviation of values was obtained within the same batch and a low reproducibility between the ranks.

2. OBJECTIUS

Desenvolupar una tècnica de digestibilitat *in vitro* per pollastres d'engreix, de menor durada que el mètode Yegani-Ankom que pugui realitzar-se en una jornada laboral.

Comparar el mètode modificat (IRTA) amb el mètode de digestibilitat *in vitro* de Yegani-Ankom, per comprovar que el nou mètode obté valors de digestibilitat similars que l'anterior, que prediguin els valors *in vivo*, sense necessitat de fer els estudis amb animal.

També, validar que el mètode Yegani-Ankom obté una estimació dels valors de digestibilitat aparent similars als resultats de digestibilitat aparent en mètodes *in vivo*

3. INTRODUCCIÓ

3.1 ÀMBIT DE TREBALL

Aquest treball s'ha realitzat a l' Institut de Recerca de Tecnologies Agroalimentàries de la Generalitat de Catalunya (IRTA) adscrit al Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació. L'Institut té centres repartits arreu de Catalunya, ja que els projectes que es desenvolupen en cadascun són específics a l'entorn de la regió on pertanyen. Concretament, aquest projecte, s'ha desenvolupat al centre Mas Bové situat a El Morell, en la secció de Nutrició, Salut i Benestar Animal, al laboratori de nutrició animal.

El programa de nutrició animal té com objectiu millorar el valor de la producció animal; principalment, a Mas Bové en animals de digestió monogàstrica, en els sectors d'avicultura i porcicultura.

3.2 FONAMENTS

El coneixement dels valors de digestibilitat dels nutrients d'un animal són importants per predir la qualitat nutricional i la quantitat d'ingesta d'aliment necessari per a que es produeixi una absorció i assimilació òptima d'aquests. i d'aquesta manera, es pugui aconseguir un bon creixement, manteniment i producció de l'animal. ²⁻⁵

La determinació de la digestibilitat més real es duu a terme mitjançant tècniques *in vivo*, però són processos laboriosos, costosos i de llarga durada, ja que necessiten molta mà d'obra, moltes instal·lacions i tenen un gran cost en el creixement i manteniment del animal. A més, és una tècnica poc reproducible, ja que cada animal pot tenir diferents índex de digestibilitat, degut a que són diferents a nivells fisiològics i a nivell d'assimilació de nutrients. ^{2,3,5,6} També, aquestes tècniques *in vivo*, s'han reglat i reduït aquelles que influeixen en el benestar animal⁷.

Degut als inconvenients d'aquesta tècnica, sorgeixen processos alternatius més senzills, ràpids, reproduïbles i més econòmics com les tècniques *in vitro*^{5,8}. Aquestes es basen en simular les condicions de una o més etapes del sistema digestiu³. Per això, els mètodes de la tècnica *in vitro* es dissenyen amb enzims específics que actuen en el procés digestiu. ³

Així doncs, per descriure una tècnica *in vitro* viable, és necessari conèixer el tracte digestiu de l'animal. A continuació es descriu breument la digestió en el tracte gastrointestinal de les aus, ja que el mètode *in vitro* desenvolupat al laboratori intenta estimar la digestibilitat dels nutrients d'aquests.

La digestió dels animals monogàstrics, comença a l'estómac on l'aliment s'hidrolitza parcialment; les proteïnes amb àcid clorhídric i pepsina, el midó i els carbohidrats poden ser hidrolitzats per amilases procedent de secrecions salivars i els greixos per lipases presents en secrecions gàstriques procedent del duodè. El pH de l'estómac normalment té un valor de 2,6 i augmenta en la ingesta d'aliment. ^{3,9,10}

La digestió continua a l'intestí prim, els enzims intestinals executen l'última etapa de digestió del midó, greixos i proteïna. Les secrecions pancreàtiques i biliars s'introdueixen al duodè. Els fluids pancreàtics incorporen una sèrie d'enzims, que són bàsicament lipases, peptidases i amilases, a més a més de bicarbonat de sodi. Els fluids biliars secretats per el fetge, introdueixen lipases i sals biliars al lumen.^{3,9,10} En pollastres l'amilasa també és secretada a l'intestí¹¹.

Finalment a l'intestí gruixut, es produeix una fermentació produïda per la microflora intestinal. Aquesta fermentació afecta principalment a la fibra dietètica, especialment polisacàrids de difícil degradació com el midó resistent.^{3,5}

3.2.1 ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS DE LA TÈCNICA IN VITRO

Inicialment, al laboratori s'utilitzava la tècnica *in vitro* descrita per Boisen^{12,13} per simular la digestibilitat en porcs on utilitzaven una tècnica *in vitro* de filtració en dues etapes d'incubació: en la primera fase, etapa gàstrica, s'incubava a 39 °C amb la pepsina solubilitzada en medi aquós a pH 2 durant 6 hores; en la segona fase, etapa intestinal, s'incubava el romanent de la etapa gàstrica, també a 39 °C amb la pancreatina solubilitzada a pH 6,8 durant 18 hores.¹³ També utilitzaven una tècnica *in vitro* de 3 fases on les dos primeres utilitzaven les anteriorment esmentades però la segona incubació tenia una durada de 4 hores i la tercera incubació, que era una simulació de l'intestí gruixut, es duia a terme en presència de *Viscozyme*, un complex multi enzimàtic que conté una gran diversitat de carbohidrases microbials, a pH 4,8 durant 18 hores.¹²

Posteriorment, es va adaptar el mètode Boisen^{12,13} per agilitar i facilitar el procediment utilitzant l'instrument Ankom que disposa d'un sistema d'agitació i un sistema de subministrament de calor i regulació de temperatura. En els mètodes anteriors, es realitzava una incubació individual per cada mostra en diferents matrassos^{12,13} i en l'adaptació s'utilitzava l'Ankom que permetia fer una incubació global. Les condicions d'incubacions eren les mateixes però es van recalculer les concentracions i el volum dels reactius, que s'utilitzen en el mètode Boisen^{12,13}, al volum en què treballa l'Ankom.

Més endavant, es va adaptar el mètode per predir la digestibilitat en aus, amb l'instrument Ankom. Aquest nou mètode, que introdueix Yegani¹, utilitza també una tècnica *in vitro* de dos etapes que contenen sistemes multi enzimàtics: la primera incubació es dur a terme en pepsina a pH 2 i a 41 °C durant 2 hores; en la segona incubació s'afegeix la pancreatina i es varia el pH a 6,8; la temperatura continua essent de 41 °C i la durada de 4 hores. Aquesta tècnica es basa amb la combinació d'altres mètodes *in vitro* previs descrits per porcs en 3 etapes¹²⁻¹⁶; en gossos en dos etapes d'una duració de 2 hores i 4 hores, respectivament¹⁷; i en aus¹⁸ on l'autor conclouia que la digestió total en aus es pot simular només en dos etapes, ja que comparava la digestibilitat del blat i el blat de moro obtenint una major reproductibilitat i una correlació major amb els valors *in vivo*. En l'article¹⁸ es compara una digestió on la segona etapa era de 7 hores d'incubació amb el mètode de 3 etapes proposat per Boisen¹². L'escassa fermentació en l'intestí gros de les aus, també es veu reflectit en articles on s'obté una bona correlació en la determinació de l'energia metabolitzable utilitzant una tècnica de dos etapes⁶ i, també s'obté una diferència poc significativa entre els valors de digestibilitat de matèria orgànica a nivell ileal i fecal².

Tot i que s'han mencionat bastants estudis que utilitzin una tècnica in vitro en aus, són molt més escassos que els estudis sobre la digestibilitat de porcs els quals tenen un ampli camp d'estudi.

3.2.2 NOVA ADAPTACIÓ DE LA TÈCNICA IN VITRO ANKOM-YEGANI (MODEL IRTA)

En aquest apartat, es comenten els fonaments de la modificació de la tècnica *in vitro* ANKOM-Yegani amb la finalitat d'escurçar la durada de la tècnica per poder-la ajustar a l'horari habitual.

Per escurçar les incubacions s'ha cercat informació sobre el tracte gastrointestinal de les aus. S'han trobat dos fonts d'informació^{4,10} que tenien discrepàncies en les estimacions sobre el temps de retenció i el pH en cada compartiment. El mètode es desenvolupa segons la referència bibliogràfica 4 .

Taula 1 Valors de pH i mitjana del temps de retenció de l'aliment en diferents compartiments del sistema digestiu dels pollastres d'engerix⁴

Compartiment del tracte gastrointestinal	Temps de duració del trànsit (min)	pH
Pap	50	5.5
Pro ventricle i pedrer (estómac)	90	2.5-3.5
Duodè	5-8	5-6
Jejúnum	20-30	6.5-7
Ili	50.70	7-7.5
Recte	25	8

Si es sumen els temps de retenció de la digestió gàstrica, s'obté un valor de 140 minuts que correspondrà al temps d'incubació de la primera etapa. El pH utilitzat en la primera etapa serà de 2,4 , ja que a partir de 2,5 la activitat enzimàtica decau significativament.¹⁹ A més totes les altres tècniques *in vitro* mencionades anteriorment sempre utilitzen un pH de 2 en aquesta etapa.^{1,12,13,17}

Si es sumen els temps de retenció màxims en la zona intestinal s'obté un valor de 123 minuts. Però reduir el temps de digestió de la segona incubació a la meitat de les tècniques esmentades anteriorment, era un canvi massa brusc i es va optar per afegir-li mitja hora més dels valors teòrics. El pH de treball es va optar per elegir 7,2 , ja que a l'íleum és la zona de més duració del trànsit i 7,2 era un valor prou proper al pH del jejúnum.

Per tant, el nou mètode desenvolupat en aquest treball, usa les següents condicions:

- Primera etapa: Temps d'incubació de la pepsina de 2 hores i 20 minuts, a pH a 2,4 i temperatura a 41 °C.
- Segona etapa: Temps d'incubació de la pancreatina de 2 hores i 30 minuts, a pH 7,2 i temperatura a 41 °C.

4. PART EXPERIMENTAL

4.1 MOSTREIG

Les mostres de treball han estat obtingudes de la fàbrica de pinsos de Mas Bové. S'han elegit 9 matèries primeres i 4 pinsos que tenen la següent composició esperada descrita en la taula següent. Aquests valors referencials s'han extret de la base de dades de l'IRTA que provenen de l'*Institut national de la recherche agronomique* (INRA) i també, de valors calculats en el laboratori IRTA.

Taula 2 Mitjana de les fraccions nutritives de les mostres analitzades elaborada a partir de la base de dades de l'INRA.

DESCRIPCIÓ MOSTRA	MATÈRIA SECA (%)	PROTEÏNA BRUTA (%)	CENDRES (%)	ENERGIA BRUTA (cal/g)	FIBRA BRUTA (%)	MIDÓ (%)	MATÈRIA ORGÀNICA (%)
BLAT	86,80	10,50	1,60	3780	2,20	60,50	85,20
ORDI	86,70	10,10	2,20	3810	4,60	52,20	84,50
SÈGOL	87,30	9,00	1,80	3750	1,90	53,80	85,50
MORESC	86,40	8,10	1,20	3860	2,20	64,10	85,20
GIRA-SOL	90,30	35,40	7,00	4100	18,20	1,80	83,30
SOJA 48%	87,60	47,20	6,30	4120	3,90	0,50	81,30
FARINA COLZA	88,70	33,70	7,00	4090	12,40	0,00	81,70
SOJA EXTRUSIONADA	88,10	34,80	5,20	4870	5,20	0,40	82,90
POLPA REMOLATXA	89,10	8,10	6,80	3620	17,30	0,00	82,30
T1 E1	85,87	20,68	7,53	3659	4,07	33,48	78,34
T3 E1	85,87	20,68	7,53	3659	4,07	33,48	78,34
T5 E1	85,65	19,49	7,26	3604	3,84	35,69	78,39
T7 E1	85,65	19,49	7,26	3604	3,84	35,69	78,39

- Les 4 primeres mostres són cereals que es caracteritzen per tenir un alt contingut en midó. Són la font principal d'energia metabolitzable en la dieta.
- Les 4 següents són matèries oleaginoses que són, juntament amb les lleguminoses, la principal font de proteïnes en l'alimentació avícola.
- La polpa de remolatxa és el subproducte del procés d'extracció de sucre de la remolatxa. Es caracteritza per aportar a la dieta fibres solubles, concretament pectina. També hemicel·lulosa i cel·lulosa.

- Les 4 últimes corresponen a pinsos de granja. Aquests s'han elaborat en un estudi que s'està realitzant a l'IRTA. Són dos classes de pinsos, els dos primers i els dos últims, que es diferencien entre ells per la temperatura de granulació al qual han estat sotmesos, 65 i 90 graus respectivament. Els dos primers tenen un 54,85% de blat i els dos últims un 55,49 % de moresc. Ambdós grups, contenen un 20% de soja 48% i un 20% de gira-sol.

4.2 MÈTODES DESENVOLUPATS EN LA DETERMINACIÓ

En la taula 3, s'agrupen les determinacions que s'han realitzat al laboratori. S'han realitzat totes aquestes per les mostres abans de la tècnica *in vitro* però, per temps i per la quantitat de residu recuperat després del tractament no ha sigut suficient per realitzar totes les determinacions corresponents.

Així doncs, es va analitzar en tots els residus obtinguts la matèria seca, la proteïna bruta i la matèria orgànica. També, es va quantificar el % de midó per les matèries primeres però no per pinsos, ja que no es disposava del reactiu suficient.

Taula 3 Classificació de les determinacions realitzades al laboratori

Determinació	Tècnica	Instrumentació	Secció
Matèria seca	Gravimètrica	Estufa i balança analítica	4.2.2
Proteïna bruta	Conductimètrica	LECO FP-528 i balança analítica	4.2.1
Fibra bruta	Gravimètrica	Digestor ANKOM, segelladora, balança analítica, estufa i mufla	4.2.6
Cendres	Gravimètrica	Balança analítica, mufla i estufa	4.2.3
Midó	Colorimètrica	Espectrofotòmetre UV-1800, bany d'aigua, olla i micropipetes	4.2.5
Energia bruta	Calorimètric	IKA C2000, granetari, premsa i balança analítica	4.2.4

A continuació, es desenvolupen els mètodes basats en els protocols de l'IRTA que s'han utilitzat per realitzar cada determinació. Encara que, per la determinació de la matèria orgànica se n'utilitzen la combinació de dos; el càlcul utilitzat es descriu en la següent fórmula.

Equació 1: Equació per determinar el % de matèria orgànica

$$\% \text{Màteria orgànica} = \% \text{matèria seca} - \% \text{cendres}$$

4.2.1 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA BRUTA SEGONS EL MÈTODE DUMAS ²⁰

Introducció

El mètode Dumas es basa en la combustió completa de la mostra en una atmosfera d'oxigen, la separació dels òxids de nitrogen de la resta de gasos produïts i la reducció dels mateixos a nitrogen molecular (N_2) el qual es mesura en una cel·la de conductivitat tèrmica.

Aquest mètode s'ha utilitzat per a la determinació de proteïna bruta a partir del nitrogen total contingut en pinsos, matèries primeres i residus de la digestió obtinguts en el tractament *in vitro*. El valor de proteïna bruta s'obté multiplicant per 6,25 el valor de nitrogen total.

Procediment analític

En el cas dels pinsos i matèries primeres, el procés analític es basa en pesar 0,2g de mostra, en paper d'estany i per triplicat, en una balança analítica. En canvi, en el cas dels residus de la digestió, es pesen 0,17 g, en paper d'estany i per duplicat. Seguidament s'embolica la mostra en forma de gota per facilitar la seva introducció a l'analitzador de Nitrogen LECO FP-528.

Seguidament, i un cop els fluxos del gas són estables i la temperatura del forn és a 850 °C, es calibra l'instrument introduint el software lectura de 12 blancs i 3 patrons de 0.20g d'EDTA (LECO Corporation, lot 1000), pesats prèviament en paper d'estany. Aquest patró d'EDTA té un valor esperat conegut de nitrogen de $9,56 \pm 0,07$.

A continuació. s'analitzen les mostres en tandes de 12 introduint el pes de mostra al software. Els valors de nitrogen es calculen directament pel software l'instrument.

Per comprovar que l'instrument està determinant correctament el % de nitrogen, s'introdueix un patró d'EDTA entre cada tanda de mostres. Si els valors d'EDTA no són els esperats, es pot fer un reajustament dels valors de patró i recalculer el % de nitrogen obtingut en les mostres.

Finalment, els resultats obtinguts es guarden en un fitxer EXCEL. El valor de proteïna s'obté directament del software sempre i quan se li hagi introduït el factor de proteïna desitjat.

Observacions:

L'EDTA és irritant i és necessari la utilització de guants.

4.2.2 DETERMINACIÓ DE MATÈRIA SECA ²¹

Introducció:

Aquest mètode gravimètric es basa en eliminar l'H₂O present en la mostra. S'han determinat seguint aquest protocol, els pinsos i les matèries primeres.

Procediment:

Primer de tot es taren les càpsules d'alumini utilitzades per pesar les mostres a analitzar. Prèviament són escalfades durant una hora a l'estufa i refredades a temperatura ambient dins d'un dessecador.

Seguidament es pesen per duplicat 4 o 5 grams de mostra i es col·loquen els pesa-substàncies a l'estufa a 103 °C durant com a mínim 4 hores per tal de deshidratar els analits.

Posteriorment s'extreuen les càpsules i es col·loquen a un dessecador aproximadament mitja hora o temps suficient per a que es refredi la mostra a temperatura ambient. Per finalitzar es pesen les càpsules.

Càlculs:

Amb la diferència de pes de mostra dels dos dies i el pes de la càpsula d'alumini es calcula la matèria seca de la mostra.

Equació 2: Equació per determinar el % de matèria seca

$$\% \text{ Matèria seca} = \frac{\text{pes mostra seca} - \text{pes pesasubstàncies}}{\text{pes mostra fresca} - \text{pes pesasubstàncies}} \times 100$$

4.2.3 DETERMINACIÓ DE CENDRES ²²

Introducció

Aquest procediment mesura la fracció mineral de les mostres, per calcinació. Mitjançant aquest protocol, es determinen els pinsos, les matèries primeres i els residus de cada mètode *in vitro*.

Procediment analític

Primer, es tara el gresol de porcellana, prèviament escalfat a la mufla durant 1 hora a 550 i refredat en dessecador fins a temperatura ambient. Un cop tarat, es pesa en el gresol de 3 a 4 g de mostra. Les mostres de residu després del tractament, *in vitro*, s'ajunten per mostra, matèries primers i pinsos i s'analitza conjuntament.

Posteriorment, es col·loquen dins d'una estufa a 200 °C ubicada dins la campana de gasos, s'engega la campana de gasos i es deixen cremar tota la nit. S'assegura la carbonització, sense inflamació de la mostra.

L'endemà s'introdueixen el gresols dins la mufla a 550 °C, es mantenen a la mufla fins l'obtenció de cendres blanques o gris clar. Són necessàries de 4 a 6 hores, és variable segons la mostra. Transcorregut el temps necessari, s'extreuen els gresols de la mufla i es deixen refredar al dessecador fins que estigui a temperatura ambient. Finalment, es pesen a la balança analítica.

Càlculs

El càlcul per obtenir el % en cendres es desenvolupa en la següent fórmula.

Equació 3: Equació per determinar el % de cendres

$$\% \text{ Cendres} = \frac{(P_1 - P_0) \times 100}{P}$$

On:

- P_1 = pes gresol + cendres (g)
- P_0 = pes gresol (g)
- P = pes de mostra (g)

4.2.4 DETERMINACIÓ DE MIDÓ, KIT MEGAZYME²³

Introducció

Aquest mètode s'utilitza per a determinar la quantitat de midó en matèries primeres, pinsos i residus de la tècnica *in vitro*.

El principi teòric es basa en la hidròlisi del midó en dues fases:

1. El midó s'hidrolitza parcialment i es solubilitza totalment.
2. Les dextrines del midó s'hidrolitzen quantitativament en glucosa amb la amiloglucosidasa.

Reactius i solucions

En aquest apartat es desenvolupa la preparació de dos tampons necessaris per realitzar el mètode i es descriu la composició del *KIT MEGAZYME, TOTAL STARCH ASSAY (K-TSTA-100A)*:

- Tampó MOPS (50mM, pH=7.0) + Clorur de calci (5mM)
Dissoldre 11.55 g MOPS en 900 ml d'H₂O. Ajustar la dissolució a pH=7 amb HCl 1M i dissoldre 0.74 g de clorur de calci dihidratat. Ajustar el volum a 1000 mL en aforat. Guardar la solució a 4°C.
- Tampó Acetat sòdic (200 mM, pH=4.5)
Afegir 11.8 mL d'àcid acètic glacial a 900 mL d'H₂O. Ajustar a pH=4.5 amb hidròxid sòdic 1M. Ajustar el volum a 1000 mL en un matràs aforat. Guardar la solució a 4°C.
- KIT MEGAZYME:
 - (Bottle1): α -amilasa termostable (100 mL, 3000 U/mL). Per emprar-la s'ha de diluir 1 ml en 30 ml de tampó MOPS. S'ha de preparar diàriament.
 - (Bottle2): Amiloglucosidasa (10 mL, 200 U/mL). S'utilitza directament.
 - (Bottle3): Tampó reactiu glucosa (concentrat, GOPOD *Reagent Buffer*). Diluir tot el contingut portant-lo a 1000 mL amb H₂O.
 - (Bottle4): Reactiu determinació de glucosa (GOPOD *Reagent Enzymes*). Diluir tot el contingut amb el litre de tampó reactiu glucosa (Bottle 3). Per guardar-lo s'ha de dividir la solució en diferents alíquotes i guardar-lo a -20°C (màxim 12 mesos).
 - (Bottle5): Solució estàndard de glucosa (*D-glucose Standard*). S'utilitza directament.
 - (Bottle6): Matriu control (*Regular Maize starch*). S'utilitza directament.

Procediment analític:

El procediment a seguir consisteix en pesar 0,1 g de mostra d'interès per duplicat i una mostra control en un tub Falcon cònic de 12 mL. Seguidament s'afegeixen 0,2 mL d'una solució de 80:20 d'etanol i aigua i s'agita la mostra amb vòrtex amb la finalitat de dispersar la mostra.

El següent pas consisteix en la hidrolització parcial del midó. Prèviament es prepara una solució de 1mL de α -amilasa, l'enzim que provoca el trencament dels enllaços $\alpha(1\rightarrow4)$, i 30 mL tampó MOPS; les condicions òptimes d'activitat de l'enzim són a pH 7 i a la temperatura de 100 °C. S'introdueixen 3mL d'aquesta solució en cada tub, es tapa i s'agita amb vòrtex. S'introdueix la reixeta que conté els tubs a un bany bullint d'aigua desionitzada i es van agitant, amb el vòrtex, els tubs cada 4,8 i 12 minuts. Un cop transcorreguts els 12 minuts es retiren els tubs del bany.

Immediatament es procedeix a fer la hidrolització total del midó. S'afegeixen 4 mL del tampó d'acetat de sodi, de pH 4,5, i 0.1 mL de l'enzim amiloglucosidasa. S'agiten els tubs amb vòrtex i s'introdueix la reixeta a un bany d'aigua a 50 °C durant 30 minuts.

Un cop finalitzada la hidròlisi, es dilueix la solució dels tubs amb aigua destil·lada en matrassos aforats de 100 mL. Posteriorment s'agafa una petita part i es centrifuga. Del sobrenedant, s'extreuen 0,1 mL per duplicat de cada analit i s'addiciona dins d'un tub de vidre de 12 mL. També es preparen dos blancs, addicionant 0,1 mL d'H₂O en cada tub i 3 estàndards, addicionant 0,1 mL de D-glucosa .

Posteriorment s'afegeixen 3 mL de GOPOD (glucosa oxidasa peroxidasa) en cada tub de vidre, es tapen els tubs i s'introdueixen en un bany d'aigua de 50 °C durant 20 minuts.

Un cop transcorreguts, s'extreu la reixeta del bany i es mantenen en repòs per temperar els tubs. Un cop refredats, s'introdueix el contingut en cubetes i es determina l'absorbància en l'espectrofotòmetre llegint a 510 nm de longitud d'ona.

Si el percentatge de midó és molt baix, en el cas del residu del tractament *in vitro*, i l'absorbància esperada molt baixa, s'intercanvia la dilució (1:1000) per addicionar 2,7 mL d'H₂O al tub Falcon (1:100) i es centrifuga directament el tub per obtenir el sobrenedant d'aquest.

Càlculs:

El càlcul de % de midó es produeix seguint el següent factor de conversió.

Equació 4: Equació per determinar el % de midó

$$\% \text{ midó} = Abs \times F \times 1000 \times \frac{1mg}{1000\mu g} \times \frac{100}{W(mg)} \times \frac{162}{180}$$

On:

- Abs = absorbància llegida front el blanc
- F = Factor de conversió d'absorbància a μg (100 μg de la glucosa estàndard/ absorbància obtinguda de la glucosa estàndard)
- 1000 = Correspon a la correcció del volum (0,1mL en 100mL)
- 100/W =Factor que expressa el midó com a percentatge de pes en la mostra
- 162/180 = Per ajustar la glucosa lliure a glucosa anhidre

Observacions:

En aquest mètode s'usen molts reactius. En la següent taula es comenta la toxicitat d'aquests.

Taula 4 Reactius usats en la determinació del midó

REACTIU	TOXICITAT	MANIPULACIÓ	Puresa	EMMAGUETAMATGE	ORIGEN
GOPOD	Perillós per la salut i perillós pel medi ambient	Guants, ulleres i vitrina	-	Congelador	TOTAL STARCH ASSAY KIT MEGAZYME
α-amilasa	Irritant i nociu per la salut	Guants i ulleres	100 ml, 3000 U/ml	Nevera	TOTAL STARCH ASSAY KIT MEGAZYME
Amilo-glucosidasa	Irritant i nociu per la salut	Guants i ulleres	100 ml, 200 U/ml	Nevera	TOTAL STARCH ASSAY KIT MEGAZYME
MOPS	Irritant	Guants	$\geq 99.5\%$	Estanteria sals orgàniques	Sigma Aldrich
Àcid acètic glacial	Corrosiu	Guants, ulleres i vitrina	$\geq 98,7\%$	Estanteria àcids orgànics	Panreactic

4.2.5 DETERMINACIÓ DE L'ENERGIA BRUTA PER CALORIMETRIA ADIABÀTICA²⁴

Introducció

El mètode es basa en la mesura del calor alliberat en la combustió completa de la mostra en ambient d'oxigen enriquit dins un calorímetre.

Aquest mètode s'utilitza per determinar l'energia bruta de matèries primeres i pinsos.

Procediment analític

Primer de tot, es prepara el calorímetre adiabàtic IKA C-2000. Abans de començar qualsevol determinació, primer s'ha d'encendre el bany refrigerant durant uns 10 minuts. Després s'encén el calorímetre IKA C-2000 basic, necessita uns 10 minuts per condicionar-se. Un cop estabilitzat, apareix un missatge a la pantalla.

Es continua el mètode preparant la mostra: Es pesa entre 0.5 i 1 gram de mostra molta i es comprimeix amb una premsa per aconseguir la mostra en forma de pastilla. Es pesa la mostra amb balança analítica dins d'un gresol, s'introdueix a l'obús i s'enganxa el fil de cotó al filferro d'ignició de l'obús. És important, assegurar que el fil del cotó està en contacte amb la pastilla per tal d'afavorir a la completa combustió de la mostra.

Seguidament, s'ha d'introduir el pes de la mostra al programa. També, el poder calorífic del fil de cotó que ja ve tallat i se'n coneix el seu valor i la constant de l'obús en què es treballa. Es tanca l'obús i s'introdueix al calorímetre.

Finalment el programa et dona el valor d'energia bruta directament.

Càlculs

Per la determinació de l'energia bruta de les mostres sempre s'ha de distingir l'obús utilitzat, ja que cada obús se li ha calculat la constant de combustió a partir de 0,5 g de l'àcid benzoic, que s'utilitza com a patró del qual es coneix el seu poder calorífic.

Observacions:

L'àcid benzoic és força irritant, nociu per la salut i perillós pel medi ambient. Es treballa en màscara per evitar-ne la inhalació, i en guants.

4.2.6 DETERMINACIÓ DE LA FIBRA BRUTA²⁵

Introducció:

Aquest mètode gravimètric es basa en determinar la substància insoluble en medi àcid i bàsic que convencionalment es coneixen com a fibra bruta. L'instrument que s'utilitza com a digestor, l'ANKOM, permet analitzar 12 mostres per duplicat (24 bosses per cicle). Dos bosses s'utilitzen com a blanc però si és necessari es pot fer la digestió d'aquestes en suspensió, en el digestor.

Procediment analític:

Cada bossa, es numera i es tara (W1) a la balança analítica. Posteriorment, es pesa 1,00 g de la matèria a analitzar (W2) i seguidament es segella la bossa amb un segellador tèrmic. Un cop segellades, es desengreixen les bosses afegint-les a un bany en uns 2 litres de acetona comercial durant 10 minuts en agitació magnètica i 10 minuts sense agitació. Es recullen i s'assequen a l'estufa a 103 °C durant tota la nit.

El dia següent es preparen 2 litres d'una solució aquosa de 0,252 N d' H_2SO_4 i 2 litres d'una solució aquosa de 0,313 N NaOH en matrassos aforats de 2 litres.

A continuació es procedeix a treballar amb el digestor ANKOM. Es col·loquen les bosses en uns plats suspensors, d'un gruix d'uns 0,5 cm, que poden sostenir 3 bosses per plat. Aquests tenen un cavitat al mig on s'hi col·loca una barra de ferro per tal d'aguantar els pisos dels plats que tenen a les vores un sistema d'ancoratge que els manté units. Es col·loca l'utensili a l'interior del digestor, s'introdueix la solució àcida i es col·loca a la part superior de la barra un pes per mantenir els plats compactes. S'encén el digestor i quan arriba a 100 °C es manté en agitació durant 30 minuts; la temperatura s'autoregula per l'instrument i es manté a 100 °C. Un cop transcorreguts es buida el digestor i es renten en agitació, dins del digestor, 3 vegades les bosses amb aigua desionitzada calenta; cada rentat té una durada 5 minuts.

Seguidament es produeix el tractament bàsic afegint la solució bàsica al ANKOM que segueix el mateix procediment que el tractament àcid. Finalment es col·loquen les bosses a l'estufa i s'assequen a 103 °C durant tota la nit.

El dia següent les bosses es deixen temperar al dessecador i es pesen (W3). Es col·loquen les bosses dins dels gresols i es descompon la mostra restant calcinant-la a 550 °C en una mufla durant un mínim de 3 hores. Es deixen temperar dins del dessecador i es pesen els gresols (W4). Prèviament és necessari tarar els gresols, ja que es pesen per controlar possibles pèrdues estructurals del gresol en una anterior calcinació i a més a més, s'escalfen a la mufla durant una hora per eliminar-ne l'aigua i així no errar el pes de les cendres.

Càlculs:

Un cop s'obtenen totes les dades es procedeix a calcular el % de fibra bruta. El càlcul de fibra bruta utilitzant la següent fórmula:

Equació 5: Equació per determinar el % de fibra bruta

$$\% F.B = \frac{W3 - C1 - (W4 - C2)}{W2} \times 100$$

On:

- La sigla C1 correspon a la correcció de la pèrdua de pes de la bossa després de la digestió essent: $C1 = W1 * W3_{\text{blanc}} / W1_{\text{blanc}}$
- C2 correspon a la correcció del pes corresponen a la bossa en cada pesada, després de realitzar la calcinació essent : $C2 = W1 * W4_{\text{blanc}}$
- W1 correspon al pes de la bossa abans de realitzar el mètode
- W2 correspon al pes de matèria introduïda a la bossa abans de realitzar el mètode
- W3 correspon al pes després de treure les bosses de l'estufa
- W4 correspon al pes de cendres

Observacions:

El reactius utilitzats en el mètode i les seves toxicitats s'expliquen en la taula següent.

Taula 5 Reactius usats en la determinació de la fibra bruta

REACTIU	TOXICITAT	MANIPULACIÓ	PURESA	ORIGEN	EMMAGUETZAMATGE
H₂SO₄	Corrosiu	Guants, ulleres i vitrina	≥ 97.0 %	Honeywell	Estanteria d'àcids inorgànics
Acetona	Inflamable i irritant	Guants, ulleres i vitrina	≥ 99.8 %	Honeywell	Armari de dissolvents orgànics
NaOH	Corrosiu	Guants i ulleres	≥ 96 %	Honeywell	Estanteria sals sòdiques

4.3 TRACTAMENTS IN VITRO

La tècnica *in vitro* utilitzada, com s'ha esmentat, es basa en dues etapes de simulació del tracte gastrointestinal. El protocol del mètode YEGANI¹ es descriu en la secció 4.4.1 . El protocol del model adaptat per l'IRTA no s'ha desenvolupat en el treball, ja que té el mateix procediment excepte per la durada i el pH de les etapes d'incubació que s'explica en l'apartat 1.3 .

Per a cada tanda, indiferentment del mètode realitzat, es pesen per quintuplicat les matèries o per quadruplicat en el cas dels pinsos. Es van realitzar 3 tandes per cada mètode i la distribució que es va realitzar en cada tanda va ser la següent:

- En la primera tanda es van analitzar: el blat, el morenc, el sègol i l'ordi
- En la segona tanda es van analitzar: gira-sol, soja 44%, farina colza i soja extrusionada
- En la tercera tanda es van analitzar: polpa de remolatxa i els 4 pinsos

Un cop fet els càlculs de digestibilitat de matèria seca, es va decidir repetir :

- Per la versió Yegani: una tanda de 4 matèries primes perquè tenien poc producte o un coeficient de variació important, i dos tandes pels pinsos, ja que tenien un coeficient de variació molt gran.
La primera tanda de la versió Yegani, es van omplir les bosses a més d'1 gram per obtenir més residu en la digestió.
- Per la versió IRTA: una tanda de 3 matèries primeres i 1 pinso, una tanda de 2 matèries primeres i 3 pinsos i una última tanda dels pinsos. Les matèries primes repetides tenien poca quantitat de residu recuperat i una gran coeficient de variació. Els pinsos també tenien una gran variació i s'analitzen per triplicat per comparar-los entre mètodes.

4.3.1 DETERMINACIÓ IN VITRO DE LA DIGESTIBILITAT ANKOM YEGANI ²⁶

Introducció

El mètode es basa en realitzar en dues incubacions a les mostres: la primera amb presència de pepsina, durant 2 hores a pH 2,0 (a 41°C) i la segona amb presència de pancreatina, durant 4 hores, a pH 6,8 (a 41°C). Les bosses amb mostra no digerida (ND) es recuperen i del residu s'analitza la fracció nutritiva.

S'ha realitzat la determinació *in vitro* de la digestibilitat de la matèria seca, proteïna bruta, midó i matèria orgànica.

Solucions

A continuació es descriuen les preparacions de les solucions utilitzades en tot el mètode. S'obvien les solucions de NaOH 1M i HCl 1 M perquè s'utilitzen per anivellar el pH.

- Tampó fosfat A, pH 6.0 (0.1 mol/l)
Es dissolen 1.98 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 29.44 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en uns 1.5 litres d' H_2O en un got de precipitats. S'ajusta el pH amb una solució de NaOH 1M o HCl 1M. Portar la solució a 2 litres en un matràs aforat amb H_2O .
- Tampó fosfat B, pH 6.8 (0.2 mol/l)
Es dissolen 19.3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 45.48g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en en uns 1.5 litres d' H_2O en un got de precipitats. S'ajusta el pH amb una solució de NaOH 1M o HCl 1M i es porta la solució a 2 litres en un matràs aforat amb H_2O .
- Solució de pancreatina (de 0.05 g/ml)
A 2.75 g de pancreatina s'afegeixen 55 ml del tampó fosfat B i es barreja amb un agitador magnètic durant 15 minuts. Es posa la barreja en 2 tubs Falcon i es centrifuguen durant 5 minuts a 3000 rpm.
Preparar la solució just abans de fer-la servir!
- Solució de pepsina (de 0.01 g/ml)
Es dissolen 0.50 g pepsina amb 50 ml HCl 0.2 M.
Preparar la solució al mateix dia de la seva utilització
- Àcid sulfosalicílic al 20%:
Es dissolen 200 g àcid sulfosalicílic amb H_2O i afegir la solució a un matràs aforat d'un litre.
- Àcid sulfosalicílic al 1%:
Es dilueixen 100 ml d'àcid sulfosalicílic al 20% en 2 litres d' H_2O en un matràs aforat.

Procediment analític

Primer de tot, les bosses de digestió es numeren i es taren (Ankom F-57). Seguidament, es pesa aproximadament 1 g de mostra (mida de partícula 0.5 mm) i es segella la bossa a uns 0.5 cm de

l'obertura; es pesa la mostra després de segellar-la. La mostra ha d'estar repartida uniformement dins la bossa. També, per cada tanda de mostres s'afegeixen sempre dos blancs (bosses sense mostra).

Posteriorment, es col·loquen les bosses amb les mostres (un màxim de 24) en el suspensor de bosses Ankom i s'introdueixen dins del digestor i es col·loca un pes damunt, per evitar el moviment de les bosses. Abans d'introduir-les al digestor, s'assegura que hi ha una bossa de cada mostra en diferents pisos del suspensor de bosses Ankom.

A continuació, en un got de precipitats de 2 litres s'afegeix una per una les quantitats de reactiu necessàries: 1250 ml tampó fosfat A, 500 ml solució HCl 0.2 M i 50 ml pepsina. Posteriorment, s'ajusta el pH de la solució a pH 2. Es prossegueix afegint la solució preparada al digestor Ankom (comprovar que totes les mostres queden cobertes), es tanca la tapa i s'engeguen les funcions d'escalfar i agitar. Quan la temperatura arriba a 41 °C, es comença a comptar el temps de 2 hores per fer la primera incubació. Passat el temps aturar la funció de mantenir la temperatura i parar l'agitació; treure amb molta cura el suspensor de bosses Ankom i col·locar-lo en un vas de precipitats de dos litres per evitar pèrdues de la solució. El líquid recollit al got de precipitats ha de retornar cap al digestor Ankom.

A continuació, s'ajusta el pH de la solució que hi ha dins el digestor Ankom a 6.8. El pH-ímetre utilitzat (Basic 20, CRISON) llegeix el pH segons la temperatura, ja que disposa d'una sonda de temperatura. Després d'haver ajustat el pH s'afegeix la solució de pancreatina (46.6 ml) al digestor Ankom i s'agita la solució. Aquesta, es prepara uns 20 minuts abans.

Seguidament, es col·loca el suspensor de bosses amb les mostres en el digestor Ankom i el volum de solució recollit en el vas de precipitats. Es col·loca el pes damunt del suspensor, es tanca el digestor i s'engeguen les funcions d'agitar i escalfar. Quan la temperatura assoleix 41 °C es mantenen les condicions durant 4 hores, segona incubació. Passades les 4 hores, s'atura la temperatura i l'agitació, s'extreu el suspensor amb les mostres en un got de precipitats de 2 litres i s'afegeix a la solució 162 mL d'àcid sulfosalicílic al 20%. Es tornen a col·locar el suspensor amb les mostres i es manté en agitació contínua durant 30 minuts, sense temperatura, per obtenir la precipitació de la proteïna no digerida en solució.

Passats els 30 minuts, s'atura l'agitació i es buida la solució que hi ha dins el digestor Ankom, obrint la vàlvula d'expulsió. Consecutivament, es fan dos rentats de les mostres: un amb l'àcid sulfosalicílic al 1% durant 5 minuts i continua agitació; i l'altre amb aigua destil·lada en agitació constant durant 5 minuts. S'utilitzen uns 1800 mL per cada rentat.

Una vegada realitzats els rentats, es retira el suspensor del digestor, es treuen les bosses i s'assequen dins de l'estufa, a 103 °C, durant tota la nit.

El dia següent, es retiren de l'estufa i es temperen dins d'un dessecador. Finalment es pesen.

Observacions:

En la taula es comenta la toxicitat dels reactius més representatius utilitzats en el mètode.

Taula 6 Reactius utilitzats en la tècnica in vitro

REACTIU	TOXICITAT	MANIPULACIÓ	PURESA	UBICACIÓ	ORIGEN
Pepsina	Citotòxic, nociu i irritant	Guants i ulleres	>250 units/mg	Nevera	Sigma, P- 7000
pancreatina	Citotòxic, nociu i irritant	Guants i ulleres	Certificat de 8 x U.S.P. specifications	Congelador	Sigma,nº P-7545; P- 1750
Àcid sulfosalicílic	Irritant, nociu en cas d'ingesta	Guants i ulleres	≥ 98 %	Estanteria reactius orgànics	Sigma- Aldrich
HCl	Corrosiu i nociu per la salut	Guants, ulleres i vitrina	≥ 37 %	Estanteria reactius inorgànics	Honeywell
Na₂HPO₄ x2H₂O	Irritant	Guants	≥ 99.5 %	Estanteria de sals de sodi	Emisure
NaH₂PO₄x2H₂O	Irritant	Guants	≥ 99.0%	Estanteria de sals de sodi	Sigma- Aldrich

4.4 DETERMINACIONS DE LA DIGESTIBILITAT IN VITRO

A continuació es descriuen les variacions utilitzades en cada determinació i els càlculs utilitzats per calcular-ne la digestibilitat. Cal comentar que s'han barrejat les bosses d'una mateixa mostra de cada tanda i s'ha classificat en flascons. Prèviament, s'ha determinat la matèria seca de cada bossa.

4.4.1 ADAPTACIONS

- En la determinació de la proteïna bruta: Es pesen per duplicat uns 0,17 g de mostra en paper d'estany. S'introdueix cada 10 mostres un patró d'EDTA.
- En la determinació del midó: Es barregen les repeticions de les matèries primes per cada tanda, ja que no es disposa de prou reactiu suficient.
- En la determinació de cendres: S'ajunten les tres repeticions de pinso per cada tanda, ja que el pes òptim per determinar les cendres és entre 3 i 4 grams. S'analitza tot el residu restant de les altres mostres.

4.4.2 CÀLCULS DE LA DIGESTIBILITAT

A continuació es desenvolupen les equacions utilitzades per calcular la digestibilitat dels components treballats.

4.4.2.1 Digestibilitat matèria seca

Equació 6: Equació per determinar la digestibilitat de matèria seca

$$\%dMS = \left[1 - \frac{(A - B)}{C} \right] \times 100$$

On:

- A = (pes de la bossa del residu final(g) - pes bossa inicial(g))
- B = (pes de la bossa del blanc després del tractament(g) – pes inicial de la bossa del blanc(g))
- C= (pes mostra inicial(g) x matèria seca de la mostra (%/100))

4.4.2.2 Digestibilitat proteïna bruta i midó

Equació 7: Equació per determinar la digestibilitat de la proteïna bruta o del midó

$$\%dProteïna\ Bruta\ o\ \%dMidó = \left[1 - \frac{A}{B} \right] \times 100$$

On:

- A = % Proteïna Bruta o % midó en la mostra final x (pes de la bossa del residu final(g) - pes de la bossa inicial (g))
- B = pes de mostra inicial(g) x % PB o %midó en la mostra inicial

4.4.2.3 Digestibilitat matèria orgànica

Aquest càlcul varia de la resta, ja que la matèria orgànica es calcula mitjançant l'equació 1.

Equació 8: Equació per determinar la digestibilitat de la matèria orgànica

$$\%dMatèria\ orgànica = \left[1 - \frac{(A_{ms} - A_{cendres})}{(B_{ms} - B_{cendres})} \right] \times 100$$

On:

- A_{ms} = % matèria seca en la mostra final x (pes de la bossa del residu final(g) – pes de la bossa (g))
- A_{cendres} = % cendres en la mostra final x (pes de la bossa del residu final(g) – pes de la bossa (g))
- B_{ms} = pes de mostra inicial(g) x % matèria seca en la mostra inicial
- B_{cendres} = pes de mostra inicial(g) x % cendres en la mostra inicial

5. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

En aquest apartat, s'il·lustren els resultats de digestibilitat obtinguts pels dos mètodes *in vitro*. Fent la mitjana dels valors obtinguts s'han elaborat a partir de tots els resultats obtinguts per aquella mostra. No obstant, s'han comprovat els *outliers* de la digestibilitat en matèria seca mitjançant el test de *Grubbs* i s'han eliminat. A més, s'han eliminat del resultat final algunes bosses degut a error aberrants.

Per a una millor comparació, s'han separat els diferents valors obtinguts de digestibilitat. Tot i que, també s'han comparat la variació de la digestibilitat de la proteïna i de la matèria seca, de forma conjunta, ja que els resultats obtinguts d'aquestes dos, són els únics calculats sense haver realitzat un mescla entre tandes.

També es discuteixen els valors mitjans obtinguts, en cada mètode, de la digestibilitat de proteïna bruta i matèria seca dels pinsos amb valors *in vivo*. Aquests són procedents d'una investigació, que s'està duent a terme a l'IRTA, de la digestibilitat d'energia aparent *in vivo* en pollastres amb els diferents pinsos classificats com a E-153.

Primer de tot, es mostren els valors de composició obtinguts al laboratori, ja que els resultats de digestibilitat *in vitro* s'han elaborat a partir d'aquests.

5.0 COMPOSICIÓ DE LES MOSTRES

Taula 7 Composició de les mostres estudiades

DESCRIPCIÓ MOSTRA	MATÈRIA SECA (%)	PROTEÏNA BRUTA (%)	CENDRES (%)	ENERGIA BRUTA (cal/g)	FIBRA BRUTA (%)	MIDÓ (%)	MATÈRIA ORGÀNICA (%)
BLAT	90,21	12,20	1,64	3966	2,05	52,84	88,57
ORDI	90,10	11,29	2,20	3983	3,72	52,67	87,90
SÈGOL	89,08	8,61	1,86	3858	1,69	54,83	87,22
MORESC	87,86	7,36	1,07	3989	1,45	64,86	86,79
GIRA-SOL	92,11	33,15	6,68	4236	17,36	2,57	85,43
SOJA 48%	89,21	46,33	6,53	4236	5,01	1,56	82,68
FARINA COLZA	90,04	35,15	6,03	4253	11,86	1,44	84,01
S. EXTRUSIONADA	89,35	33,47	4,92	4961	3,89	9,70	84,43
POLPA DE REMOLATXA	92,99	10,43	4,41	3766	16,52	0,97	88,58
T1 E1	87,95	20,10	6,21	4086	4,16	33,58	81,74
T3 E1	88,11	20,63	6,30	4054	4,32	32,80	81,81
T5 E1	87,53	20,40	6,51	3984	4,31	33,21	81,02
T7 E1	87,56	19,92	6,41	4009	3,86	34,37	81,15

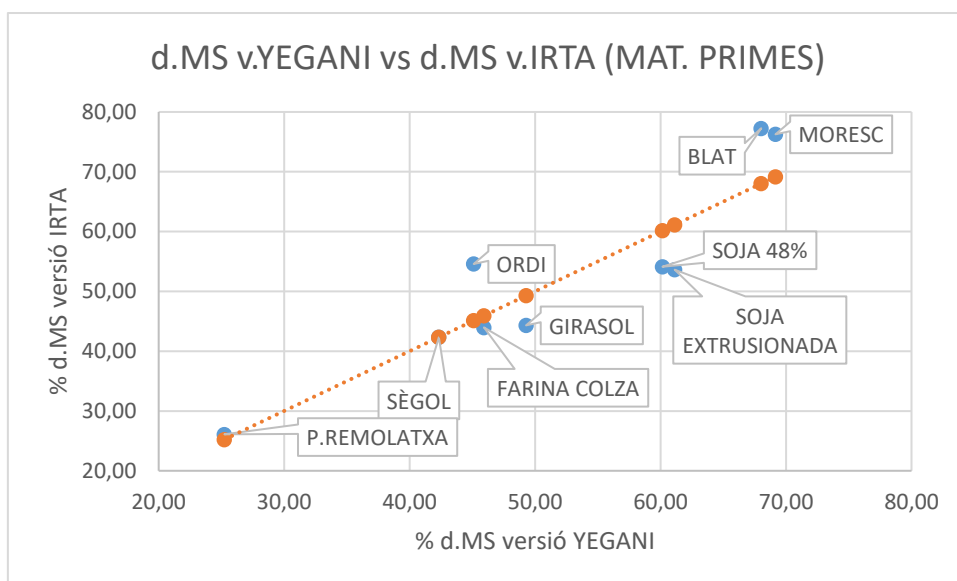
Aquesta taula ens mostra que s'han obtingut diferències respecte als valors referencials de la taula 2. En general, s'obtenen valors majors de matèria seca, d'energia bruta i matèria orgànica. També es determina una major quantitat o presència de midó en les matèries oleaginoses i en la polpa de remolatxa.

5.1 DIGESTIBILITAT DE LA MATÈRIA SECA

Taula 8 Comparativa de la digestibilitat de matèria seca obtinguts

MOSTRA	MÈTODE YEGANI			MÈTODE IRTA		
	% dMS	Des. Std%	CV%	% dMS	Des. Std%	CV%
BLAT	68,03	6,30	9,26	77,27	6,30	8,16
ORDI	45,11	7,08	15,70	54,58	10,87	19,91
SÈGOL	42,33	1,42	3,36	42,32	11,13	26,30
MORESC	69,16	2,07	2,99	76,26	6,94	9,09
GIRA-SOL	49,28	2,19	4,44	44,31	3,09	6,97
SOJA 48%	60,15	2,54	4,22	54,12	4,47	8,26
FARINA COLZA	45,93	2,59	5,63	43,97	4,73	10,76
S. EXTRUSIONADA	61,13	5,97	9,77	53,62	5,54	10,32
P.REMOLATXA	25,24	2,62	10,36	26,09	0,54	2,05
T-1	64,87	9,15	14,10	53,30	6,31	11,84
T-3	62,35	10,80	17,33	49,73	7,53	15,14
T-5	65,62	6,03	9,19	53,64	8,02	14,95
T-7	59,46	6,20	10,43	59,31	6,84	11,54

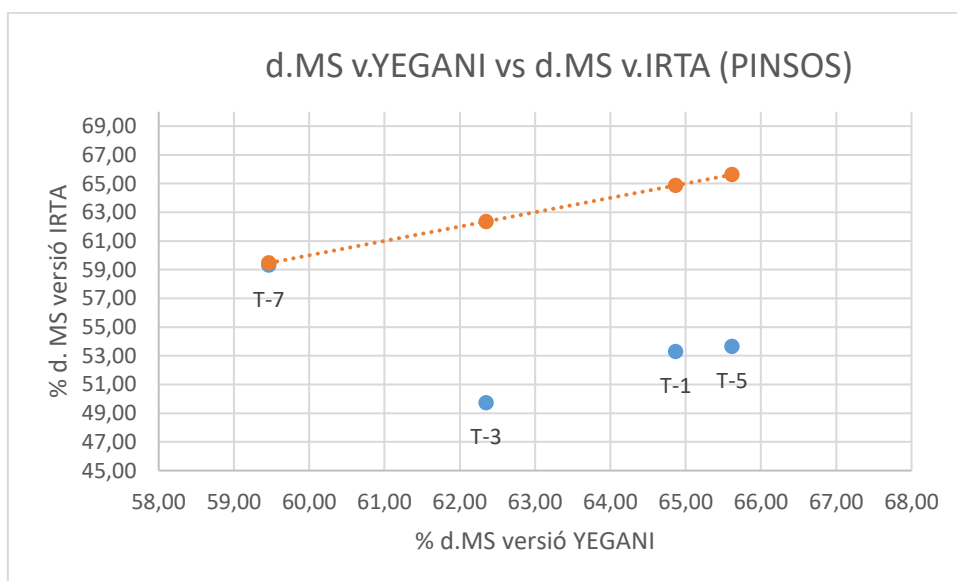
En la taula anterior, s'expressen les mitjanes, les desviacions i el coeficient de variació per la digestibilitat de cada mostra. Es pot observar que les matèries primes, excepte l'ordi i el sègol, tenen menys coeficient de variació en la determinació que el pinsos. Per aquest motiu, es compara la digestibilitat de matèries primes i pinsos per separat.



Il·lustració 1 Discrepància de la digestibilitat de la matèria seca entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes

La il·lustració 1 mostra que es produeix una sobreestimació de la digestibilitat de matèria seca pels cereals, excepte el sègol, i una subestimació de les matèries oleaginoses en el mètode IRTA, en front el mètode Yegani. La polpa de remolatxa i el sègol obtenen una digestibilitat similar entre els dos mètodes.

La línia de tendència, regressió lineal $y=x$, ha estat desenvolupada a partir dels valors de digestibilitat de matèria seca en el mètode Yegani. Aquesta indica que els valors per damunt d'ella representen una major digestibilitat i els valors per sota, una pitjor digestibilitat en el mètode IRTA.



Il·lustració 2 Discrepància de la digestibilitat de la matèria seca entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos

En la il·lustració 2, s'ha creat la línia de tendència amb el mateix fonament però, a partir dels valors de digestibilitat de matèria seca dels pinsos. A partir d'aquesta, es pot observar que es produeix una subestimació de la digestibilitat amb el mètode IRTA excepte pel pinso T-7.

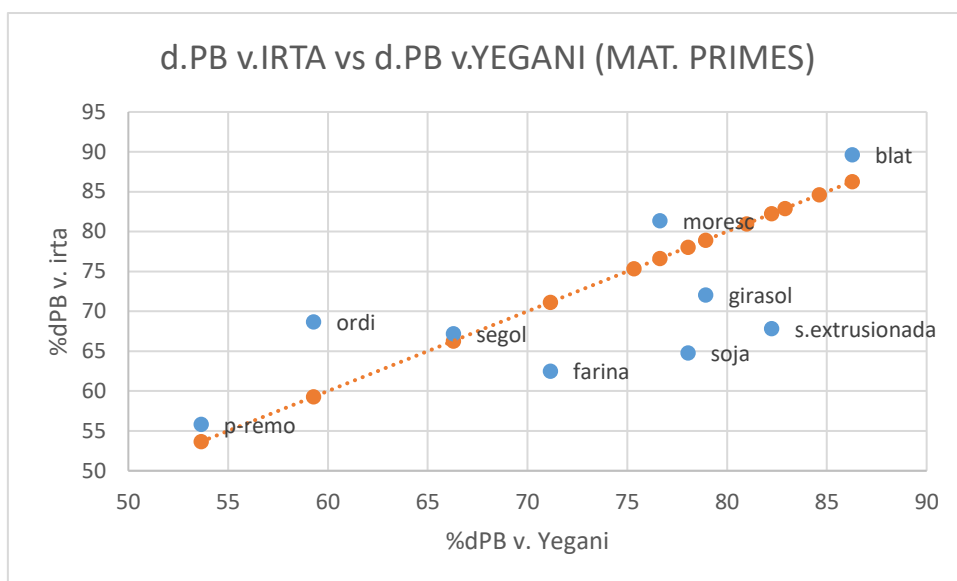
5.2 DIGESTIBILITAT DE LA PROTEÏNA BRUTA

Taula 9 Comparativa de la digestibilitat de la proteïna bruta

MOSTRA	MÈTODE YEGANI			MÈTODE IRTA		
	% dPB	Des .Std%	CV%	% dPB	Des. Std%	CV%
BLAT	86,28	3,78	4,38	89,64	2,48	2,77
ORDI	59,29	5,18	8,74	68,67	9,09	13,24
SÈGOL	66,29	0,82	1,24	67,20	6,37	9,48
MORESC	76,64	1,54	2,01	81,36	4,54	5,57
GIRASOL	78,93	0,89	1,13	72,07	1,53	2,12
SOJA 48%	78,05	1,28	1,64	64,81	3,38	5,22
FARINA COLZA	71,15	3,53	4,96	62,51	5,19	8,30
S. EXTRUSIONADA	82,24	2,68	3,26	67,85	3,71	5,47
P.REMOLATXA	53,65	1,60	2,99	55,82	0,32	0,57
T-1	84,63	4,08	4,82	74,76	4,85	6,49
T-3	80,98	5,78	7,14	72,08	4,10	5,69
T-5	82,90	3,11	3,75	75,45	4,40	5,83
T-7	75,34	4,83	6,41	78,10	3,74	4,78

La taula 8 engloba els resultats obtinguts per la digestibilitat de la proteïna bruta en les diferents mostres. De manera global, el mètode YEGANI obté majors valors que el mètode IRTA, excepte pels cereals. A més a més, el coeficient de variació també és major en la versió IRTA.

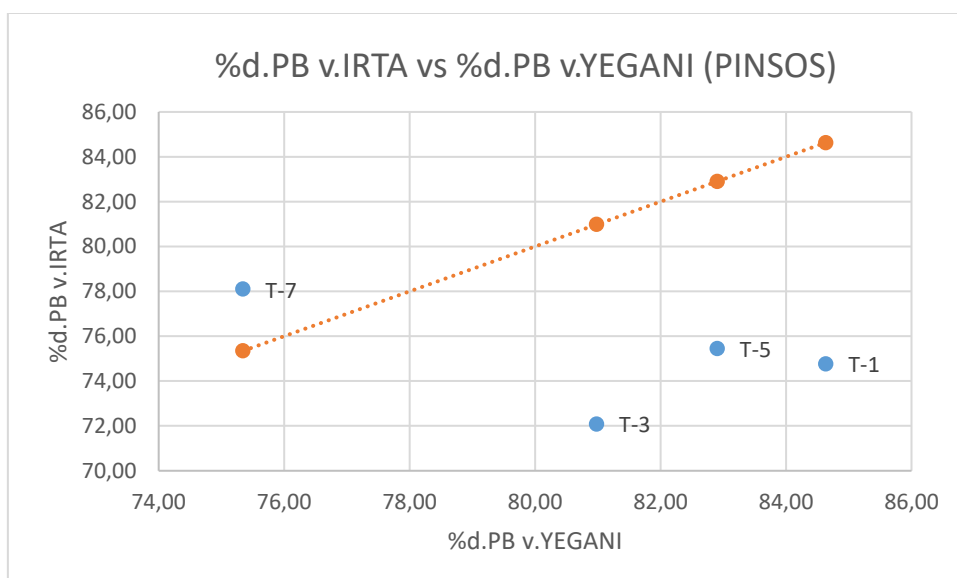
S'han representat les comparacions de matèries primes i pinsos per separat pel mateix motiu que en la matèria seca i, també per una major claredat dels resultats.



Il·lustració 3 Discrepància de la digestibilitat de la proteïna bruta entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes

En el cas de la digestibilitat de la proteïna bruta en matèries primes, també s'obtenen els mateixos resultats que en la digestibilitat en matèria seca. Tot i que, la sobreestimació dels cereals i la polpa de remolatxa és quasi inapreciable, excepte per l'ordi, i la subestimació de les lleguminoses és major. Aquestes diferències es corresponen a la proporció inicial de proteïna bruta. Les oleaginoses que contenen major quantitat de proteïna bruta es digereixen millor en el mètode Yegani, ja que, en global, el temps d'incubació en presència d'enzims que degraden la proteïna és d'una hora i deu minuts superior que l'altre mètode.

La línia de tendència s'ha elaborat amb la mateixa finalitat comparativa que en els anteriors gràfics, encara que a partir dels valors de digestibilitat de la proteïna bruta en matèries primes.



Il·lustració 4 Discrepància de la digestibilitat de la proteïna bruta entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos

En la il·lustració 4, a partir de la línia de tendència que diferencia la millor digestibilitat entre mètodes, s'observa com la digestibilitat de proteïna bruta és superior en la versió Yegani.

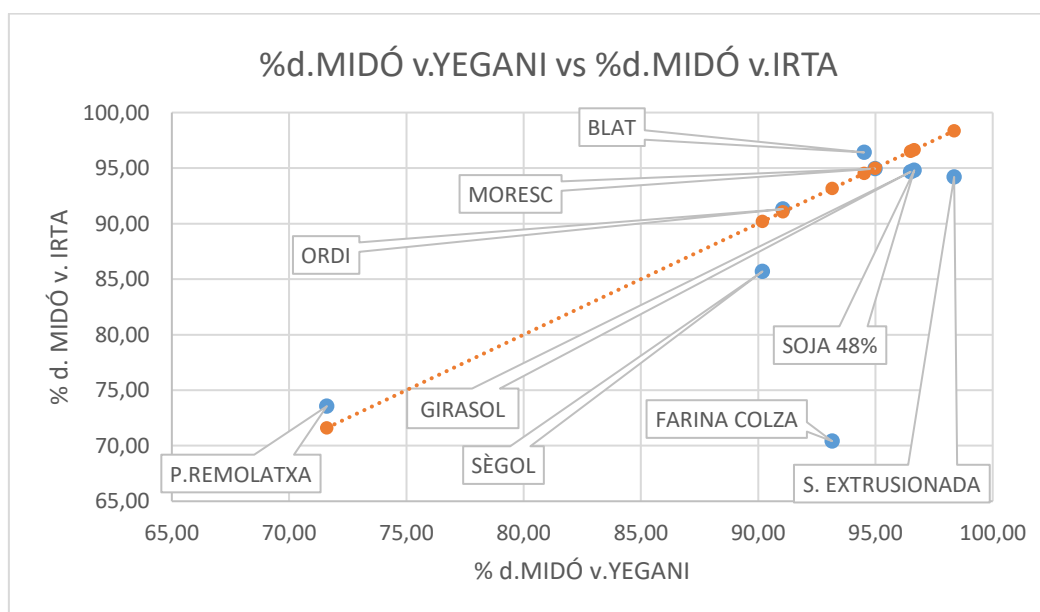
Aquest resultat és esperat, ja que tal i com s'ha comentat en la figura anterior, el temps d'incubació influeix en la digestibilitat. No obstant, el pinso T-7 obté una major digestibilitat en la versió IRTA, ja que les repeticions d'aquest pinso en el mètode Yegani són bastant inferiors si es comparen amb els valors de les repeticions obtingudes pels altres pinsos.

5.3 DIGESTIBILITAT DEL MIDÓ

Taula 10 Comparativa de la digestibilitat del midó en matèries primeres

MOSTRA	MÈTODE YEGANI			MÈTODE IRTA		
	% dMido	Des. Std%	CV%	% dMido	Des. Std%	CV%
BLAT	94,52	1,30	1,38	96,41	0,93	0,97
ORDI	91,06	1,14	1,25	91,31	2,02	2,21
SÈGOL	90,18	0,24	0,27	85,69	2,84	3,32
MORESC	94,99	0,33	0,35	94,95	1,40	1,47
GIRASOL	96,50	0,15	0,15	94,66	0,29	0,31
SOJA 48%	96,66	0,21	0,22	94,80	0,50	0,53
FARINA COLZA	93,15	0,32	0,35	70,41	2,34	3,33
S. EXTRUSIONADA	98,36	0,25	0,25	94,21	0,69	0,73
P.REMOLATXA	71,61	0,98	1,37	73,56	0,19	0,26

En la taula anterior, s'observa que es produeix una digestibilitat major de midó en el mètode YEGANI. La digestibilitat dels pinsos no es va calcular per motius especificats en la secció 4.2.



Il·lustració 5 Discrepància de la digestibilitat del midó entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes

En la figura anterior es compara la digestibilitat del midó entre els dos mètodes i s'observa que el sègol, la farina colza, la soja extrusionada es digereixen millor en el mètode Yegani i les altres matèries obtenen valors similars de digestibilitat. El valor més discrepant és el de la farina colza que és una de les matèries primes que conté poc midó.

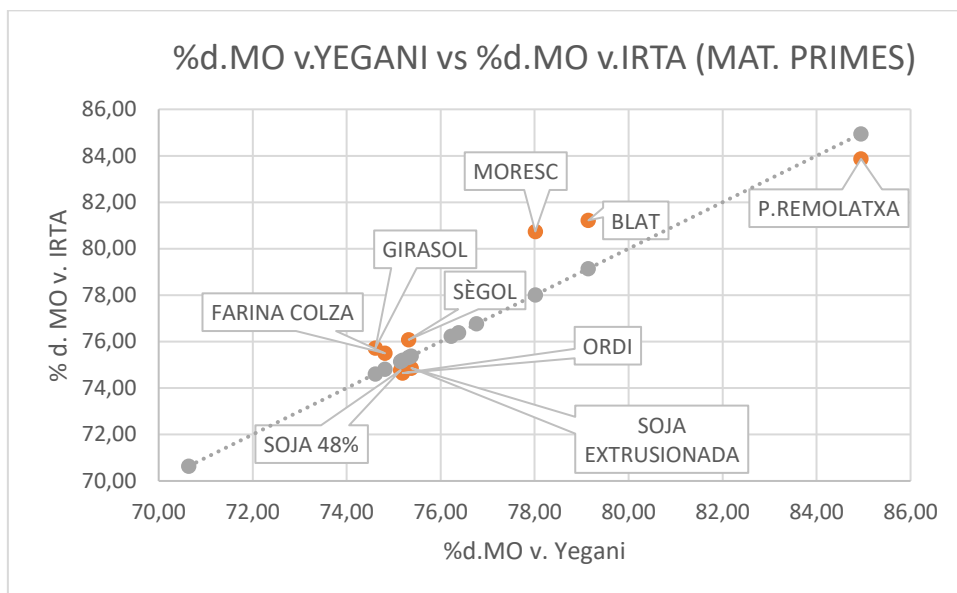
5.4 DIGESTIBILITAT DE LA MATÈRIA ORGÀNICA

Taula 11 Comparativa de la digestibilitat de la matèria orgànica

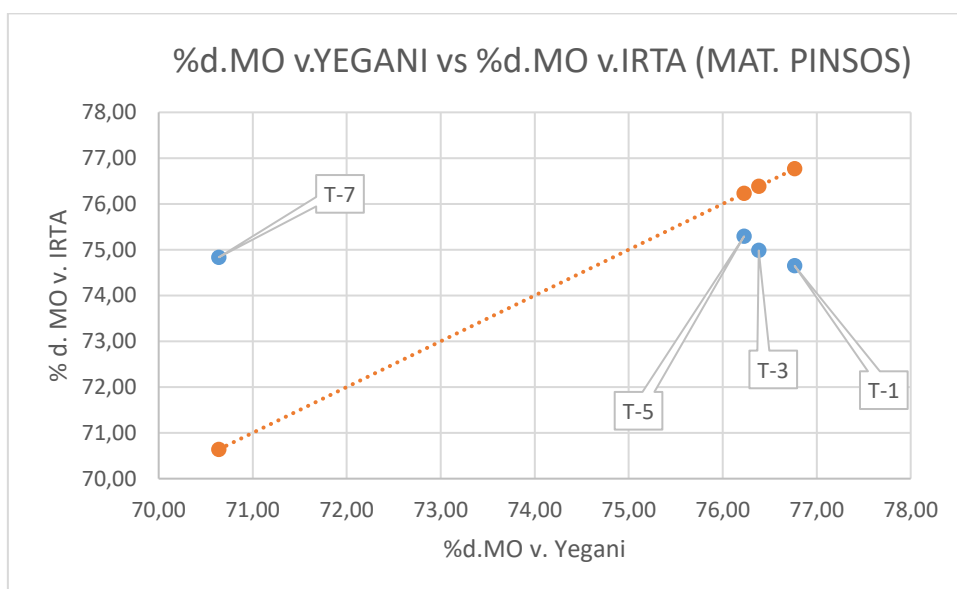
MOSTRA	MÈTODE YEGANI			MÈTODE IRTA		
	% dMO	Des. Std%	CV%	% dMO	Des. Std%	CV%
BLAT	79,15	4,71	5,95	81,22	4,62	5,69
ORDI	75,19	3,16	4,20	74,64	5,62	7,53
SÈGOL	75,32	0,60	0,80	76,08	3,34	4,39
MORESC	78,01	1,45	1,86	80,74	4,97	6,15
GIRASOL	74,61	1,08	1,44	75,73	1,33	1,75
SOJA 48%	75,15	1,55	2,07	74,77	2,42	3,24
FARINA COLZA	74,82	1,19	1,59	75,50	1,75	2,31
S. EXTRUSIONADA	75,38	3,71	4,92	74,86	2,92	3,89
P.REMOLATXA	84,95	0,52	0,61	83,87	0,12	0,14
T-1	76,77	5,96	7,76	74,65	3,34	4,47
T-3	76,38	5,53	7,24	74,98	3,34	4,45
T-5	76,23	3,90	5,12	75,29	3,48	4,63
T-7	70,64	3,45	4,88	74,83	4,03	5,38

En la taula anterior, es veu reflectit que la digestibilitat de la matèria orgànica dóna valors similars entre els dos mètodes. Es representen els valors de digestibilitat en dos gràfics diferents per una millor claredat.

Si es comparen les matèries primes, il·lustració 6, s'observa que la digestibilitat en el mètode IRTA i el mètode Yegani són similars. No obstant, els valors que s'allunyen més de la línia de tendència són el blat i el moresc, tenen una diferència de 2% entre els mètodes, no són prou significatius per diferenciar les digestibilitats de matèria orgànica dels dos mètodes.



Il·lustració 6 Discrepància de la digestibilitat de la matèria orgànica entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en matèries primes



Il·lustració 7 Discrepància de la digestibilitat de la matèria orgànica entre el mètode Yegani i el mètode IRTA en pinsos

La digestibilitat de pinsos és major en el mètode Yegani que en el mètode IRTA. El valor del pinso T-7 és molt més diferent que el de la resta. El pinso T-7 també ha obtingut valors més baixos de digestibilitat amb el mètode Yegani en les altres determinacions. Aquí ha resultat ser més significatiu, ja que s'ha determinat la matèria orgànica de totes les repeticions de manera conjunta.

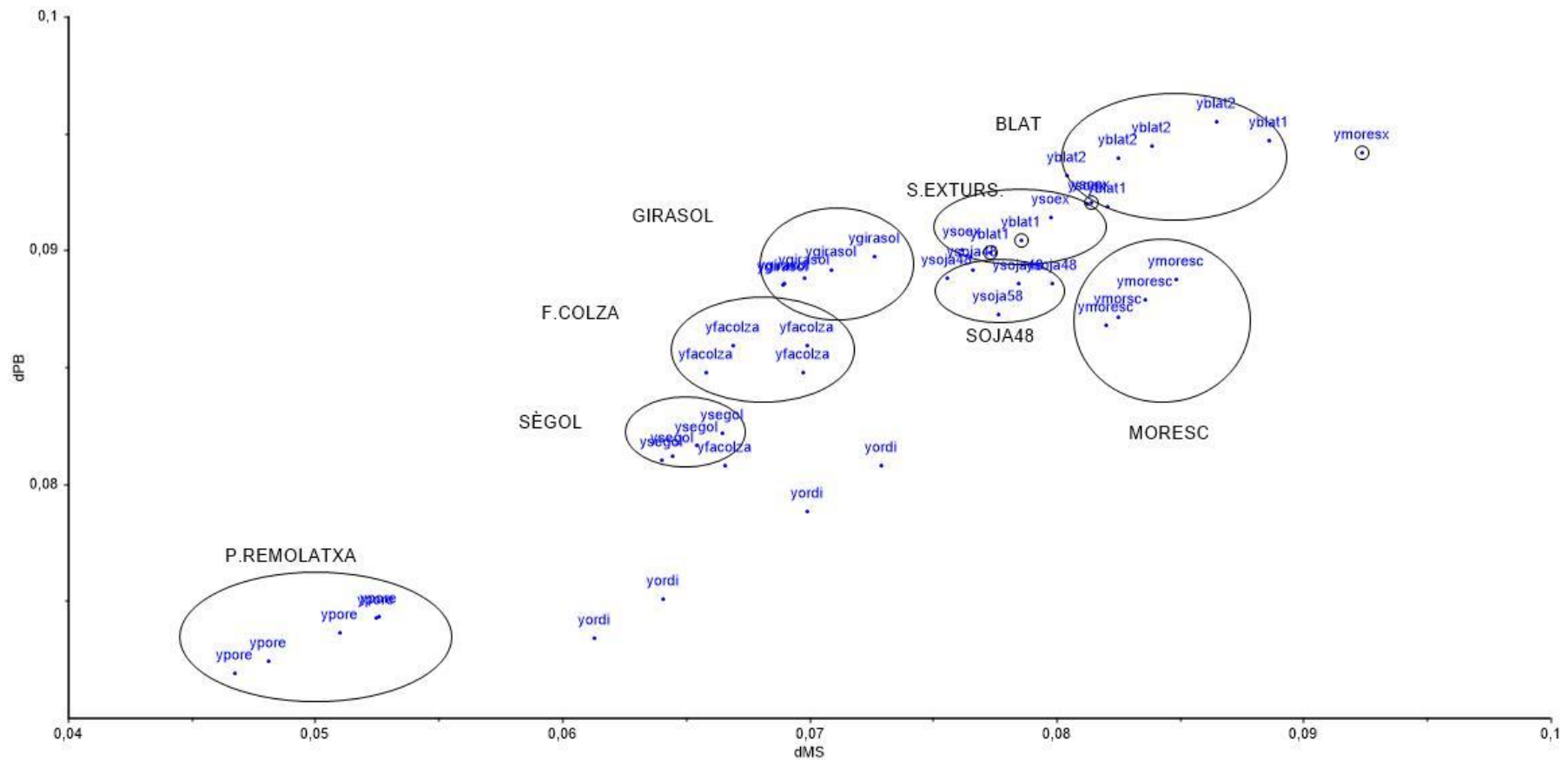
5.5 COMPARATIVA ENTRE LA DIGESTIBILITAT DE MATÈRIA SECA I PROTEÏNA BRUTA

En aquesta secció s'han representat, mitjançant el programa Unscrambler, la digestibilitat de la matèria seca, eix d'abscisses, en front la digestibilitat de proteïna bruta, eix d'ordenades, per buscar relacions entre les mostres i comprovar si una variable té influència sobre l'altre. Només s'han pogut comparar aquestes dos digestibilitats, ja que són les úniques determinacions que han analitzat les repeticions per separat.

Els valors obtinguts s'han sotmès a la transformació $y = \arcsin[X^{1/2}/100]$ per tal de normalitzar les dades i que tinguin el mateix pes estadístic.

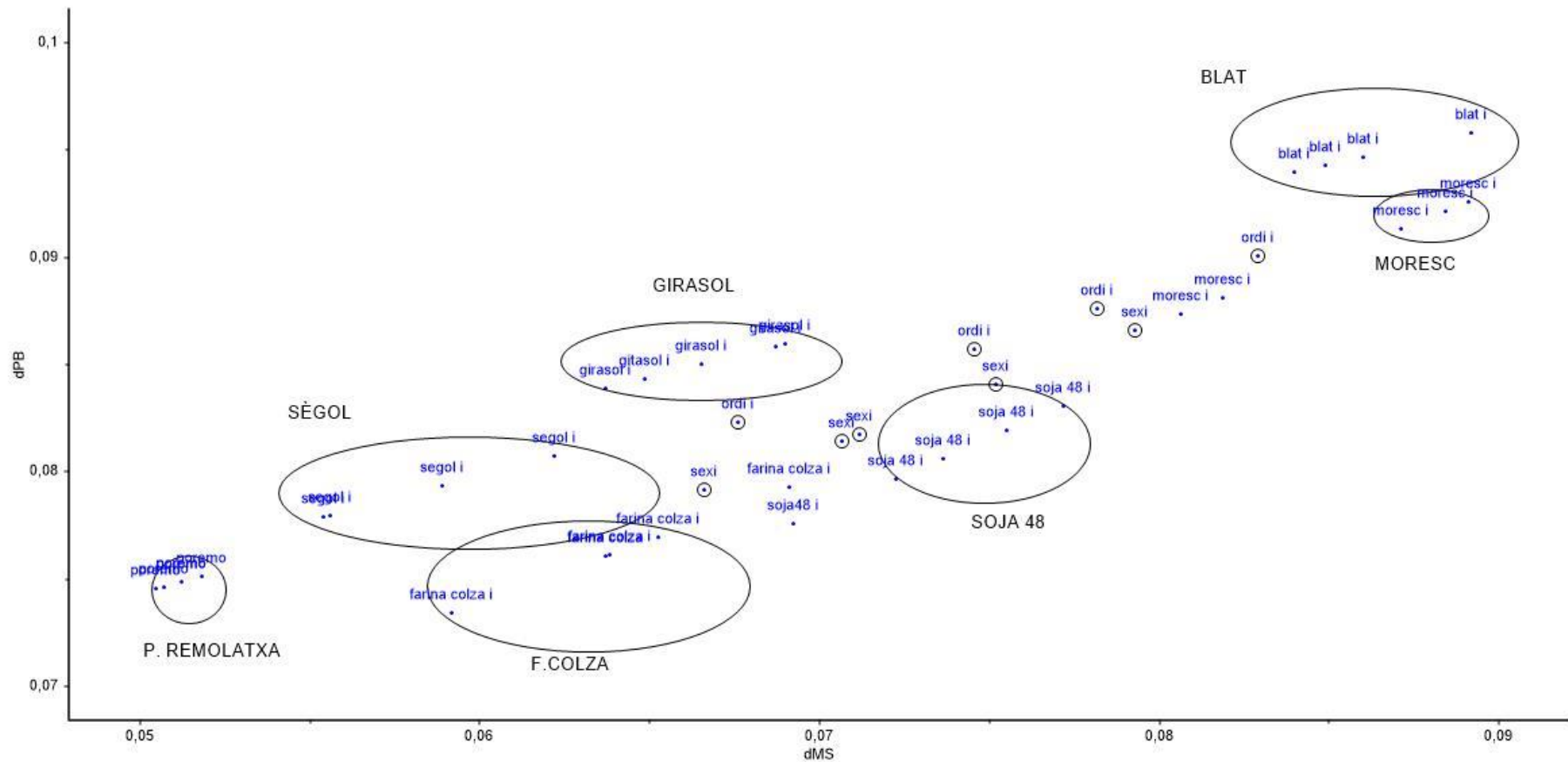
A continuació es mostren cinc figures corresponents a:

- Il·lustració 8: valors de les matèries primeres en el mètode Yegani els quals es poden agrupar entre classes
- Il·lustració 9: valors de les matèries primeres en el mètode IRTA i les seves agrupacions
- Il·lustració 10: valors de les 6 matèries primes repetides i les seves repeticions en el mètode IRTA
- Il·lustració 11: globalització de les digestibilitat de les matèries primes en els dos mètodes
- Il·lustració 12: valors discrepants en les 3 repeticions dels pinsos en el mètode Yegani
- Il·lustració 13: valors discrepants en les 3 repeticions dels pinsos en el mètode IRTA



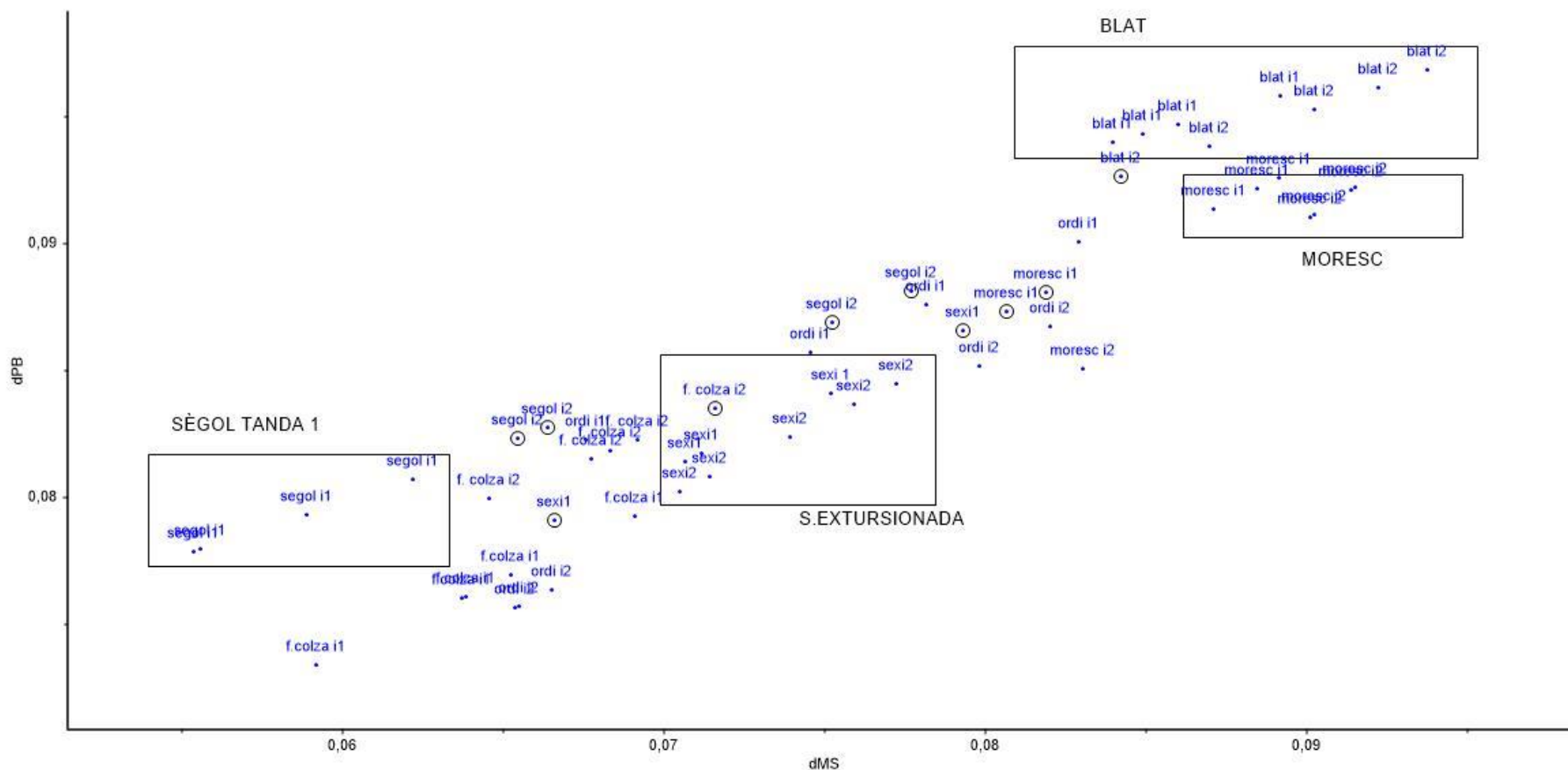
Il·lustració 8 Classificació en grups de les matèries primes del mètode Yegani per la digestibilitat de proteïna bruta i la digestibilitat de matèria seca

Les matèries primes en el mètode Yegani es poden agrupar tenint en compte les dos digestibilitats. Tot i que, en general, el valors en només una tanda ja són bastant variables entre sí. A més, hi ha dades sense classificar o punts classificats en mostres que no ho són.



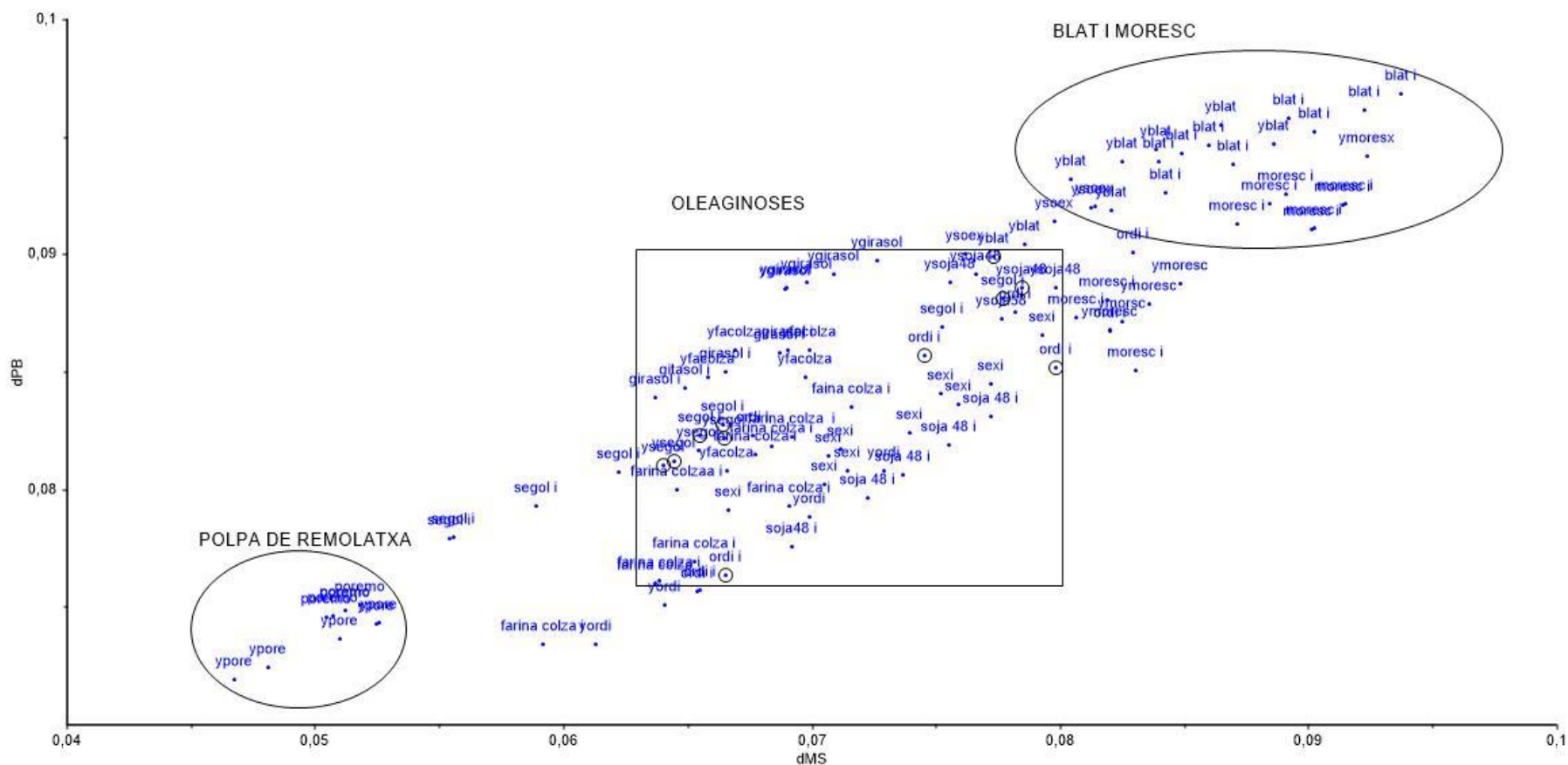
Il·lustració 9 Classificació de les matèries primes en el mètode IRTA

En el mètode IRTA, en només una tanda de matèries primes, ja no es poden classificar algunes de les mostres. Les mostres d'ordi, de soja extrusionada i de moresc no es classifiquen adequadament i, en excepció de la polpa de la remolatxa, els valors de digestibilitat són poc precisos.



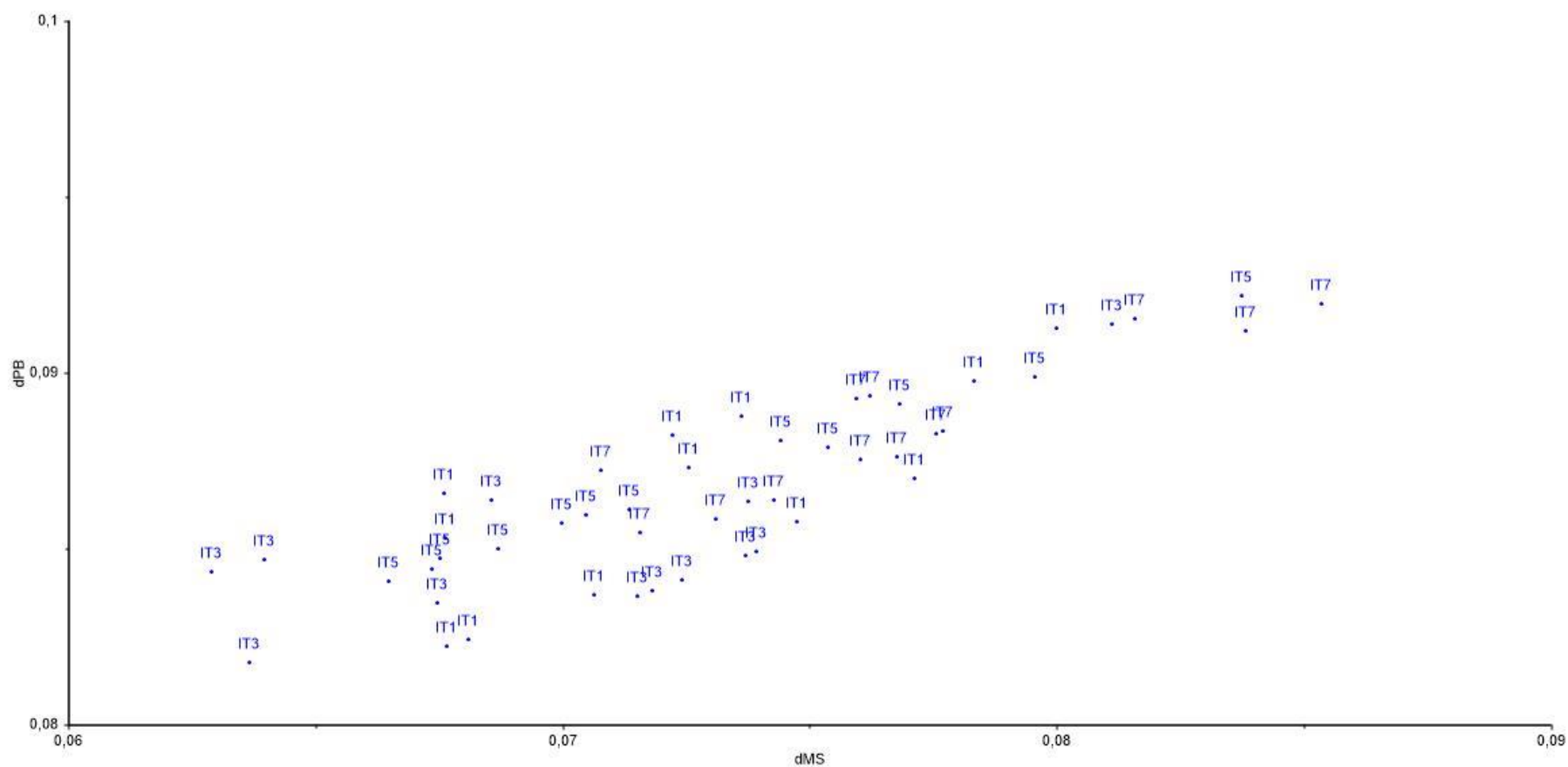
Il·lustració 10 Comparació de la repetició de les matèries primes en el mètode IRTA

Si es comparen les repeticions de les matèries primes del mètode IRTA, es pot veure que els resultats de digestibilitat obtinguts varien de manera significativa entre mostres. S'observa diferència entre tandes de manera significativa.



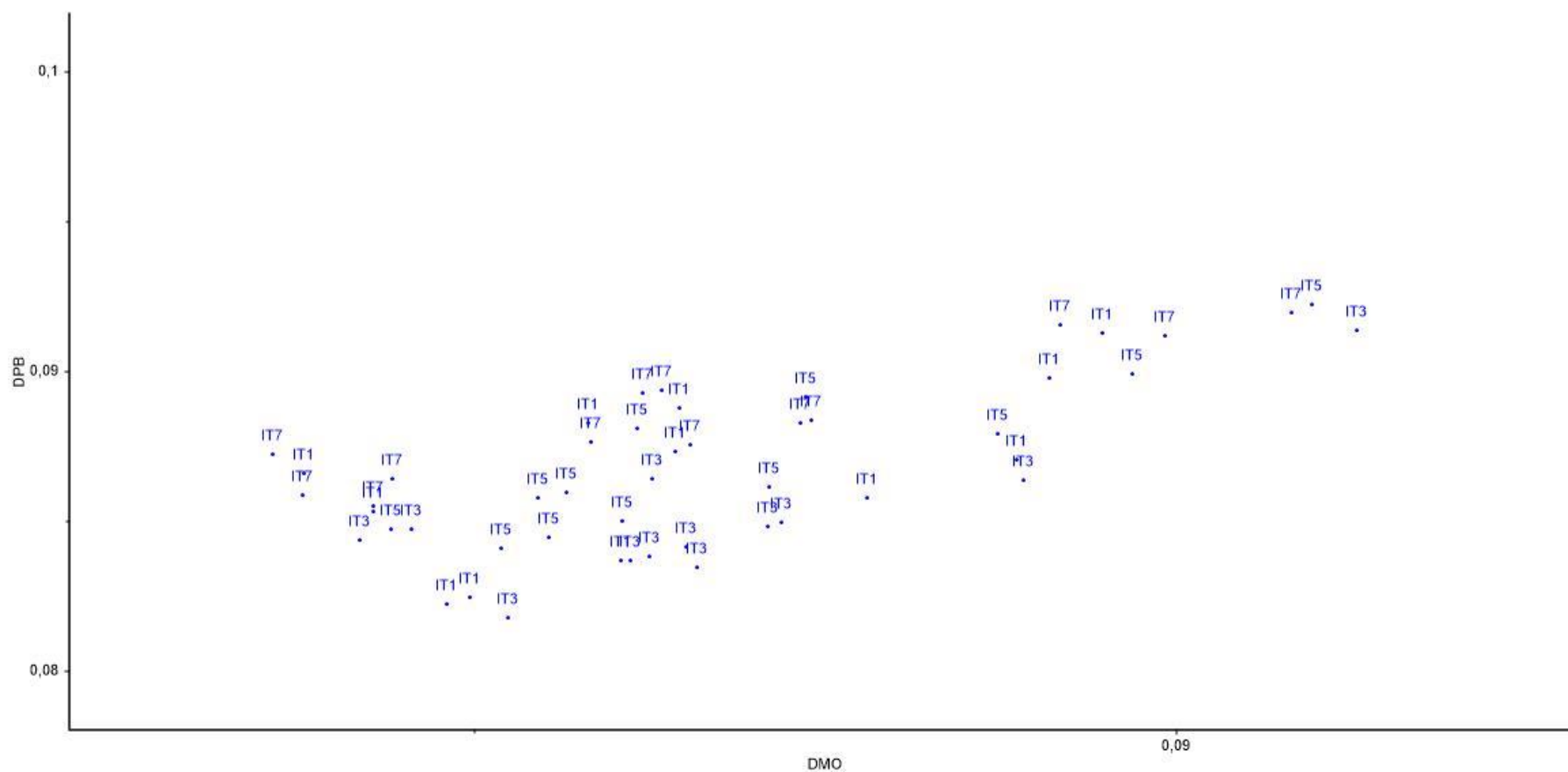
Il·lustració 11 Valors de la digestibilitat de les matèries primes en els dos mètodes

Si s'analitzen els valors dels dos mètodes, es pot observar que es poden diferenciar tres grans grups tal i com es mostra en el gràfic. Per tant, la composició d'una matèria influeix en la variació de la digestibilitat. Com per exemple, l'ordi obté valors molt discrepants i la polpa de remolatxa valors similars.



Il·lustració 12 Discrepàncies entre les digestibilitats de les 3 repeticions en pinsos en al mètode Yegani

Si s'analitzen en conjunt els valors de les repeticions de pinsos pel mètode Yegani, és impossible separar-los en funció de les dos digestibilitats. No es pot identificar cap tipus d'agrupació dins del gràfic.



Il·lustració 13 Discrepàncies en les digestibilitats de les 3 repeticions dels pinsos al mètode IRTA

La discrepància entre les repeticions obtingudes en el mètode IRTA impossibilita l'agrupació dels pinsos i són indistingibles entre sí.

5.6 COMPARACIÓ DE LA DIGESTIBILITAT DE MATÈRIA SECA I PROTEÏNA BRUTA DELS PINSOS AMB VALORS *IN VIVO*

A continuació es comparen els valors de la digestibilitat de la matèria seca i de la proteïna bruta entre els dos mètodes i valors *in vivo*.

Taula 12 Comparativa de la digestibilitat de matèria seca i de proteïna bruta dels pinsos amb els valors *in vivo*

	v.YEGANI	v.IRTA	IN VIVO	v. YEGANI	v. IRTA	IN VIVO
MOSTRA	% dMS	% dMS	% dMS	% dPB	% dPB	% dPB
T-1	64,87	53,30	62,1	84,63	74,76	82,30
T-3	62,35	49,73	64,3	80,98	72,08	82,20
T-5	65,62	53,64	65,5	82,90	75,45	81,40
T-7	59,46	59,31	67,2	75,34	78,10	83,00

Es pot observar que el mètode Yegani aproxima millor els valors de digestibilitat. El pinso T-7 és l'únic valor que discrepa més dels resultats *in vivo*. Aquest ja s'ha comentat en altres comparatives que resultava ser un valor inferior del resultat real degut a tantes obtingudes no ben digerides.

També es pot observar que les digestibilitats aparents entre el pinsos dels valors *in vivo*, varien menys que pels mètodes estudiats, sobretot en la digestibilitat de proteïna bruta. I, a més a més, els resultats obtinguts en cada mètode tenen un coeficient de variació molt elevat. Per tant, els valors mitjans obtinguts, no es poden considerar semblants als valors *in vivo*.

6. CONCLUSIONS

S'ha desenvolupat un mètode de digestibilitat *in vitro* que es pot realitzar en un dia dins l'horari de la jornada laboral però, aquest mètode estima pitjor les digestibilitats que el mètode Yegani, mètode inicial del qual se n'ha fet l'adaptació.

S'han comparat la digestibilitat de matèria seca, proteïna bruta, midó i matèria orgànica entre els dos mètodes i s'ha conclòs:

- En la digestibilitat de matèria seca es produeix, en el mètode IRTA, una sobreestimació de la digestibilitat dels cereals, excepte el sègol, una subestimació de la digestibilitat de les matèries lleguminoses i una subestimació en la digestibilitat dels pinsos.
- En la digestibilitat de la proteïna bruta, en el mètode IRTA, s'observa una lleugera sobreestimació dels cereals, una subestimació en les lleguminoses i una subestimació en els pinsos. Aquest fet és degut a que per major proporció de proteïna, el procés de digestió d'aquesta requereix més temps d'incubació. La diferència del temps d'incubació en presència de peptidases és de una hora i deu minuts.
- En la digestibilitat de midó en el mètode IRTA obtenen uns valors de digestibilitat similars amb el mètode Yegani, excepte pel sègol, la soja extrusionada i la farina colza, que es subestimen. Els dos últims presenten poc % de midó en la fracció nutritiva, sobretot la farina colza que resulta ser el valor que té més discrepàncies entre mètodes.
- En la digestibilitat de matèria orgànica s'obtenen valors similars, ja que es varen barrejar les bosses de cada mostra de les diferents tandes i s'ha reduït la diversitat entre tandes.
- Quan es comparen la digestibilitat de matèria seca i de proteïna bruta entre les repeticions de pinsos i algunes matèries primes es comprova que el mètode no és reproduïble, ja que obtenen valors discrepants entre tandes.
- Al interpretar tots els resultats de digestibilitat de proteïna bruta i matèria seca, es comprova que la digestibilitat es veu influïda per la composició i la proporció de les fraccions nutritives. Per això, els pinsos, els quals estan elaborats a partir d'un ampli ventall de matèries primes, obtenen valors més discrepants i obtenen valors majors de coeficient de variació. Per tant, el dos mètodes són poc robustos.

L'última conclusió extreta és que cap dels dos mètodes estima adequadament la digestibilitat aparent en comparació amb els valors *in vivo*. Tot i que, pel mètode Yegani les mitjanes obtingudes s'assemblaven als valors *in vivo*, la desviació estàndard dins d'una mateixa tanda i la poca reproductibilitat entre tandes són massa significatives.

CONCLUSIONS

An *in vitro* digestibility method has been developed which it can be carried out in a workday, but this method simulates the digestibility worse than the Yegani method, the initial method which has been done the adaptation.

The digestibility of dry matter, raw protein, starch and organic matter between the two methods has been compared. It has been concluded:

- In the digestibility of dry matter, IRTA method produces an overestimation in the digestibility of cereals, except in the rye, and an underestimation in the digestibility of the feed and the legumes matter.
- In the digestibility of the crude protein in the IRTA method there is a slight overestimation of the cereals and an underestimation of the legumes and the feed. This fact is owing to having the greater amount of protein to digestive, it requires more time of incubation. The difference of the incubation time with presence of peptidases is one hour and ten minutes.
- In the digestibility of starch in the IRTA method, it obtains similar digestibility values compared with the Yegani method, except for rye, extruded soybeans and rapeseed meal, which are underestimated. The last two exceptions present a few percent of starch in the nutritional fraction, especially the rapeseed meal which presents a highest difference of value among both methods.
- In the digestibility of organic matter similar values are obtained since the bags of each sample of the different batches were mixed. Thus, the difference between batches is reduced.
- Comparing the digestibility of the dry matter and raw protein in both methods between in each repetition of feed and in some raw matter. It can be checked that both methods are not replicable since they show non-correlated values between batches.
- When interpreting all the digestibility results of crude protein and dry matter, it can be tested that digestibility is influenced by the composition and the proportions of its nutritional fractions. For this reason, the feeds, which are made of wide range of raw matter, obtain more diverging values. Therefore, the two methods are not robust.

The last conclusion is that any method estimates suitably the apparent digestibility compared with *in vivo* values. Regarding the Yegani method, although the average values are similar to the *in vivo* ones, the standard deviation within the same incubation and the low reproducibility between batches are too significant.

7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Yegani, M.; Swift, M. L.; Zijlstra, R. T.; Korver, D. R. Prediction of energetic value of wheat and triticale in broiler chicks: A chick bioassay and an in vitro digestibility technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183* (1-2), 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.03.010>.
- (2) Gardner, G. E.; Kennedy, L.; Milton, J. T. B.; Pethick, D. W. Amino acid availability in poultry —in vitro and in vivo measurements. *Aust. J. Agric. Res.* **1999**, *49*, 317-327. <https://doi.org/10.17700/jai.2015.6.1>.
- (3) Boisen, S.; Eggum, B. O. Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutr. Res. Rev.* **1991**, *4* (01), 141-159. <https://doi.org/10.1079/nrr19910012>.
- (4) Gauthier, R. *Intestinal health, the key to productivity: The case of organic acids*; 2002.
- (5) Gonzalvo, S. Métodos para la determinación de la digestibilidad in vitro de alimentos para animales monogástricos. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. 2001, p 70-79.
- (6) VALDES, E. V; LEESON, S. Measurement of Metabolizable Energy in Poultry Feeds by an In Vitro System. *Poult. Sci.* **1992**, *71* (9), 1493-1503. <https://doi.org/10.3382/ps.0711493>.
- (7) CE. DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *D. Of. la Unión Eur.* **2010**, 33-79. <https://doi.org/2010/63/EU>.
- (8) Bryan, D. D. S. L.; Abbott, D. A.; Classen, H. L. Digestion kinetics of protein sources determined using an in vitro chicken model. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2019**, *248* (January), 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.002>.
- (9) Jacob, J.; Pescatore, T.; Cantor, A. Avian digestive system. *Coop. Ext. Serv. Univ. Kentucky.College Agric.* **2011**, 1-6.
- (10) Denbow, D. M. *Gastrointestinal Anatomy and Physiology*, Sixth Edit.; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00014-2>.
- (11) Osman, A. M. Amylase in chicken intestine and pancreas. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1982**, *73* (3), 571-574. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90076-1).
- (12) Boisen, S.; Fernández, J. A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1997**, *68* (3-4), 277-286. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00058-8).
- (13) Boisen, S.; Fernández, J. A. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1995**, *51* (1-2), 29-43. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)00686-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)00686-4).
- (14) Noblet, J.; Jaguelin-Peyraud, Y. Prediction of digestibility of organic matter and energy in the growing pig from an in vitro method. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *134* (3-4), 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.07.008>.
- (15) Regmi, P. R.; Ferguson, N. S.; Zijlstra, R. T. In vitro digestibility techniques to predict apparent total tract energy digestibility of wheat in grower pigs1,2. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87* (11), 3620-3629. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1739>.

- (16) Regmi, P. R.; Sauer, W. C.; Zijlstra, R. T. Prediction of in vivo apparent total tract energy digestibility of barley in grower pigs using an in vitro digestibility technique. *J. Anim. Sci.* **2008**, 86 (10), 2619-2626. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1058>.
- (17) Hervera, M.; Baucells, M. D.; Blanch, F.; Castrillo, C. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **2007**, 91 (5-6), 205-209. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00693.x>.
- (18) Losada, B.; García Rebollar, P.; Cachaldora, P.; Álvarez, C.; Méndez, J.; Blas, C. de. A comparison of the prediction of apparent metabolisable energy content of starchy grains and cereal by-products for poultry from its chemical components, in vitro analysis or near-infrared reflectance spectroscopy. *Spanish J. Agric. Res.* **2013**, 7 (4), 813. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009074-1096>.
- (19) Caffin, J.; Carr, B.; Caffin, J.; Carr, B.; Gomez, I. C. J.; Caffin, J. Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. **1999**.
- (20) Paris, N.; Algaba, L. M. *Determinació de proteïna bruta segons el mètode Dumas*; IT-0602-L-100118; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2018.
- (21) Morales, M. *Determinació d'humitat i matèria seca*; IT-0602-L-10001; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2017.
- (22) Morales, M. *Determinació de Cendres*; IT-0602-L-10002; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2017.
- (23) Algaba, L. ; Morales, M. *Determinació de midó Kit Megazyme*; IT-0602-L-10031; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2018.
- (24) Morales, M. *Determinació de l'energia bruta per calorimetria adiabàtica*; IT-0602-10112; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2018.
- (25) López, D. *Determinació de fibra bruta amb ANKOM*; IT-0602-L-10126; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2018.
- (26) Pérez, A. *Determinació in vitro de la digestibilitat Ankom Yegani*; 0602-L-10162; Instruccions tècniques del SIGI: IRTA, Esp, 2019.