



Departamento de Producción Animal y  
Ciencia de los Alimentos,  
Universidad de Zaragoza  
Miguel Servet 177,  
50013 Zaragoza (España)

## **Sistema sencillo de fermentación *in vitro* con flujo discontinuo de las fases líquida y sólida**

**Manuel Fondevila**

Patente nº P 200600043,  
Oficina Española de Patentes y Marcas  
(Ministerio de Industria, Turismo y Comercio)

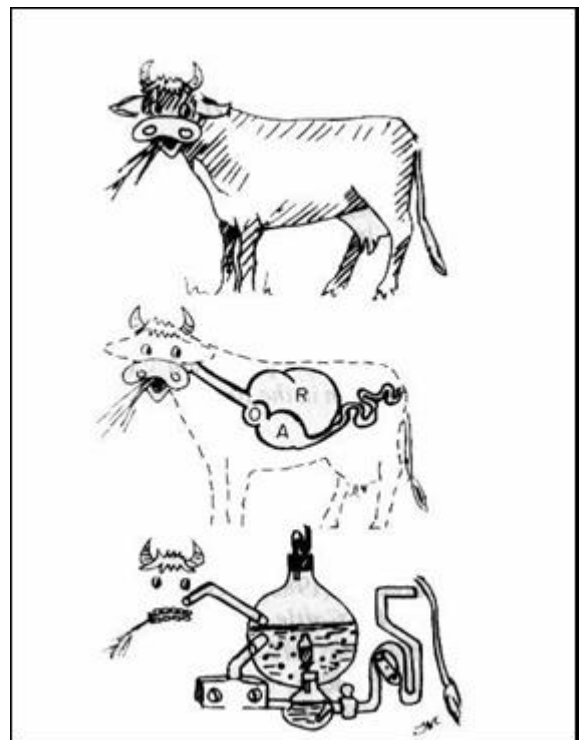
*El sistema de fermentación *in vitro* que se propone intenta simular las condiciones de fermentación ruminal, evitando algunos de los inconvenientes de los sistemas de cultivo continuo, con el fin de favorecer su aplicación en condiciones rutinarias. En concreto, una de las grandes ventajas del sistema es su bajo coste en relación a otros sistemas desarrollados anteriormente.*

*Este sistema puede aplicarse como herramienta de simulación *in vitro* por grupos de investigación que mantengan líneas enfocadas al estudio del ecosistema microbiano y los procesos de fermentación digestiva, así como de los factores que inciden sobre ellos. Del mismo modo, puede ser aplicado por laboratorios agropecuarios como técnica rutinaria de valoración de alimentos para rumiantes, caballos, conejos y otros herbívoros, estimando parámetros digestivos y rendimientos productivos del ganado, y por empresas dedicadas a la alimentación animal, para valorar el potencial de tratamientos físicos y químicos de los alimentos, o de aditivos incorporados en la dieta.*

### **Antecedentes**

En los herbívoros, la utilización de los nutrientes del alimento depende en gran medida de la interacción con su ecosistema microbiano digestivo, que fermenta los componentes del alimento rindiendo productos que constituyen buena parte de los nutrientes que utiliza el animal hospedador. Por tanto, la valoración nutritiva y el conocimiento de la fisiología digestiva dependen en gran medida del potencial de fermentación de la población microbiana, a su vez en función de las características de alimento, del ambiente de fermentación y de la población microbiana, así como del tiempo de permanencia del alimento en el órgano de fermentación.

Los estudios de fisiología digestiva y valoración nutritiva *in vivo* son laboriosos y costosos, por lo que desde hace décadas se han propuesto distintas alternativas *in vitro* que permitan estimar las características de la fermentación microbiana a partir de simulaciones en laboratorio. Las diferencias entre ellas residen en el compromiso entre el grado de simplicidad del sistema -en función del número de variables que afectan a la fermentación que se controlen- y la exactitud y precisión que se pretende alcanzar. Además, el diseño de los sistemas debe ser adaptado a los parámetros específicos que se pretende medir. Como consecuencia de las diferencias entre los sistemas de fermentación en su simplicidad, el rango de variación de su coste económico es extremadamente amplio.



(J.W. Czerkawski)

Czerkawski (1986) clasifica los distintos tipos de sistemas de fermentación *in vitro* en: sistemas sin intercambio de sólido o líquido, sistemas de flujo continuo y sistemas semipermeables. Los primeros (Tilley y Terry 1963) consisten en tubos o botellas de vidrio en los que se incuba durante cierto tiempo un sustrato determinado con una solución mezcla de inóculo microbiano y distintas proporciones de tampón -para mantener constante el pH óptimo para la actividad microbiana-, minerales y una solución reductora -para minimizar la concentración de oxígeno en el medio, estimando la fermentación por desaparición gravimétrica del sustrato. En otros modelos, la fermentación se estima en función del volumen de gas producido, bien a presión constante por el desplazamiento del émbolo de jeringas de vidrio (Menke y col. 1979) o bien a volumen constante, registrando los cambios de presión en una botella cerrada (Theodorou y col. 1994). Posteriormente se han propuesto diversas variantes automatizadas (Pell y Schofield 1993; Cone y col. 1996; Davis y col. 2000).

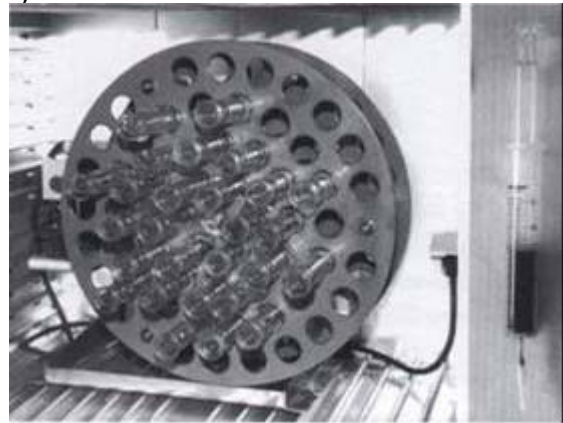
Las técnicas de determinación de la producción de gas aportan un valor más ajustado de la fermentación que la estimación gravimétrica y permiten seguir en el tiempo la cinética de fermentación con un elevado número de muestras. Además, los sistemas de Menke y col. (1979) y Theodorou y col. (1994) cuentan con la ventaja de un fácil manejo y bajo coste. Por contra, no tienen en cuenta el efecto del flujo de líquido y sólido sobre la eficiencia de síntesis microbiana o la retroinhibición de la actividad enzimática por acumulación de catabolitos, por lo que pueden llevar a desviaciones en la estimación de la fermentación. Además, las condiciones de tampón del sistema obligan a desarrollar la incubación a pH entre 6,5 y 6,9.

Los sistemas de cultivo continuo se inoculan, y luego se mantienen bombeando continuamente una solución tampón, a pesar de que el flujo de salida del rumen en condiciones fisiológicas no es realmente constante. El flujo de tránsito del líquido se establece por salida a través de un filtro o por simple extravasación. El material sólido se administra en dosis repartidas en el tiempo (Hoover y col. 1976; Teather y Sauer 1988) o mediante introducción escalonada en bolsas de nylon, como en el Rusitec (Czerkawski y Breckenridge 1977) o en el Cositec, una adaptación de este último para los monogástricos (Stuck y col. 1995). Excepto en el caso del modelo de Teather y Sauer, basado en la estratificación del contenido del fermentador y su salida homogénea simulando la del contenido

ruminal, los otros modelos se basan en un flujo diferenciado de entrada/salida de las fases sólida y líquida para mantener estables las poblaciones microbianas, tanto bacterias como protozoos, más sensibles a un flujo rápido.

**Sistema de determinación de la fermentación microbiana: a) por volumen (Menke y col., 1979); b) mediante cambios de presión (Theodorou y col., 1994)**

a)

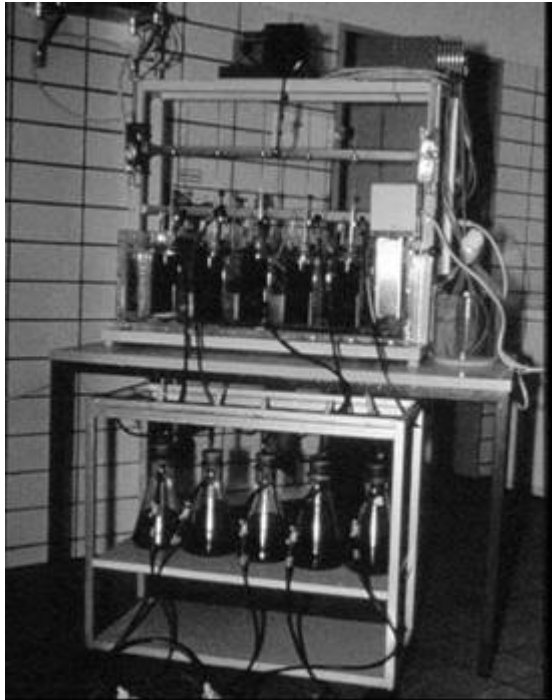


b)



Sin embargo, este tipo de aparatos no son aptos para incubaciones a corto plazo, ya que requieren varios días para alcanzar el equilibrio. Además, todos estos modelos de fermentación requieren un equipamiento complejo (bomba peristáltica, sistema de regulación constante del pH, y un sistema de agitación, de control de temperatura y de flujo continuo de gas) para el control de las condiciones de cultivo. Además, el modelo de Hoover incluye un sistema de alimentación de distribución automática. Este equipamiento aumenta la complejidad del sistema, además de aumentar considerablemente su precio.

### Sistema de cultivo semicontinuo RUSITEC (Czerkawski y Breckenridge 1977)



Otros autores intentaron aproximarse a las condiciones de fermentación *in vivo* mediante el uso de membranas semipermeables de diálisis para el flujo diferenciado de la fase líquida. Abe y Kumeno (1973) y Nakamura y Kurihara (1978) desarrollaron modelos de este tipo, de gran complejidad pero que no pueden utilizar sustratos sólidos. Su escasa aplicabilidad se demuestra en que estos modelos no han sido utilizados de nuevo, ni siquiera por sus creadores. En contraste, una versión más simple, enfocada al estudio de la fermentación en animales monogástricos, fue la propuesta por Iversen y col. (1989), aunque su modelo sólo controla el flujo de fase líquida, y se enfoca al estudio de cambios en las poblaciones microbianas, y no a la estimación de los procesos fermentativos.

### Referencias

- Abe M., Kumeno F. 1973. *J. Anim. Sci.* 36: 941-948.  
Cone J.W., van Gelder A.H., Visscher G.J.W., Oudshoorn L. 1996. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61: 113-128.  
Czerkawski J.W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford, UK.  
Czerkawski J.W., Breckenridge G. 1977. *Br. J. Nutr.* 38: 371-384.

- Davis Z.S., Mason D., Brooks A.E., Griffith G.W., Merry R.J., Theodorou M.K. 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83: 205-221.  
Hoover W.H., Crooker B.A., Sniffen C.J. 1976. *J. Anim. Sci.* 43: 528-534.  
Iversen J.J.L., Nielsen M., Cox R.P. 1989. *Biotechnol. Practice* 1: 11-15.  
Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. 1979. *J. Agric. Sci.* 93: 217-222.  
Nakamura F., Kurihara Y. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 500-513.  
Pell A.N., Schofield P. 1993. *J. Dairy Sci.* 76: 1063-1073.  
Stuck K., Faul K., Hylla S., Stein J., Breves G. 1995. *Z. Gastroenterol.* 33: 241-246.  
Teather R.M., Sauer F.D. 1988. *J. Dairy Sci.* 71: 666-673.  
Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.  
Tilley J.M.A., Terry R.A. 1963. *J. Br. Grassl. Soc.* 18: 104-111.

### Detalle de un contenedor del sistema de cultivo continuo (Hoover y col., 1976)





## Descripción del sistema

El sistema de fermentación *in vitro* con flujo discontinuo de las fases líquida y sólida comprende un grupo de hasta 12 unidades de fermentación bajo condiciones de incubación, en atmósfera de CO<sub>2</sub>, a una temperatura entre 37 y 39°C y en baño de agitación.

## Detalle de una unidad de incubación



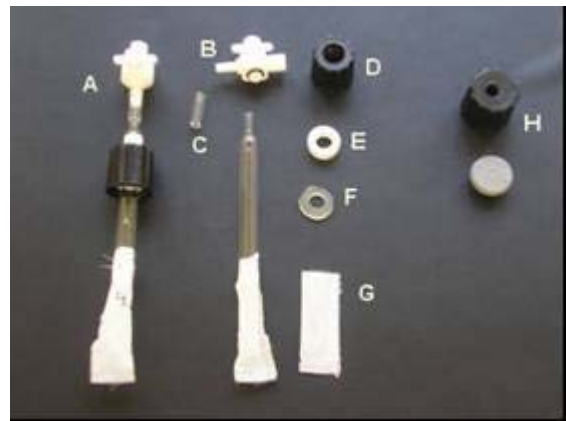
Cada unidad es una botella de vidrio pirex de unos 200 ml de volumen total, provista en su parte superior de dos bocas:

- la *primera boca*, inclinada respecto del eje de altura de la unidad, está provista de un tapón/septum de goma sujeto por una rosca. Esta boca está configurada para permitir la introducción de la fase sólida, la cual pasa directamente a la unidad de fermentación, en una sola dosis, a fin de estimar la cinética de fermentación microbiana con flujo de fase líquida. Además, el septum de goma permite ser atravesado a intervalos regulares por una aguja conectada a una sonda de presión para determinar la evolución de la producción de gas.

- como principal novedad, el sistema dispone de una *segunda boca*, situada perpendicularmente a la base de la unidad, a través de la cual se inocula y extrae periódicamente la fase líquida a través de un tubo de vidrio, conectado por su extremo exterior a

una válvula de dos vías. Su extremo interior está provisto, adherido a él, de un filtro de 150 µm de tamaño de poro -para simular el tamaño medio de partícula sólida que sale del rumen- que se introduce hasta el último tercio de la altura de la unidad de fermentación.

**Sistema de filtrado (A): B, válvula; C, tubo de unión de silicona y tubo de vidrio; D, E, F, rosca y arandelas de silicona/PTFE para cierre; G, filtro de nylon. Cierre de la primera boca (H).**



## Funcionamiento

Mediante esta configuración, el sistema permite la valoración de alimentos en unas condiciones determinadas de pH, y considerando un ritmo de tránsito de la fase líquida predeterminado. Para ello, se introduce inicialmente una cantidad (1,4 g) del sustrato a valorar y una solución de incubación (112 ml) conteniendo (por litro):

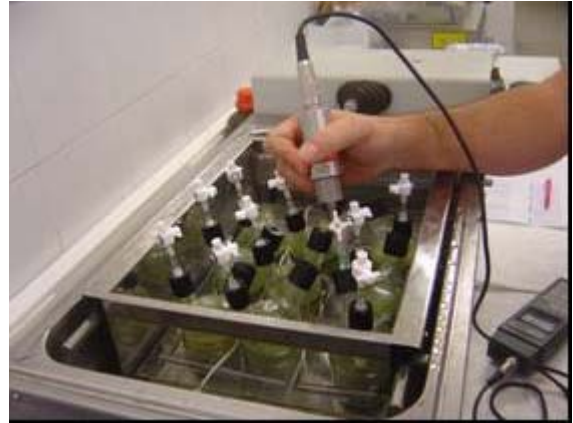
- agua destilada, 474 ml;
- solución de macrominerales (5,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 6,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,6 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O por litro), 238 ml;
- solución tampón (35 g NaHCO<sub>3</sub> + 4 g (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> por litro), 238 ml;
- agente reductor (mezclando POR ORDEN 47,5 ml agua destilada, 2 ml NaOH 1 N y 313 mg cisteina-HCl), 50 ml.

Previo a la inoculación, se preparará la solución de incubación, calentándola a 38 °C y burbujeándola con CO<sub>2</sub> durante 30 – 45 minutos, luego se añadirá el agente reductor.

Finalmente, se añadirá el inóculo microbiano, constituido por 28 ml de contenido ruminal filtrado a través de doble capa de gasa. Inmediatamente

después, la unidad de fermentación se introducirá en el baño de agitación, comenzando el periodo de control de la fermentación.

#### Tanda de incubación con 9 unidades



La adición a intervalos regulares de solución de incubación en el medio permite un control preciso del pH de fermentación. No obstante, no se recomienda intentar ajustar el pH a valores por debajo de los comentados, dado que supondrían concentraciones demasiado bajas de  $\text{HCO}_3^-$ .

#### Solución tampón

Para simular en la incubación diferentes condiciones ambientales de pH provocadas por dietas variando en su relación forraje: concentrado, además de la dosis anterior ( $0,111 \text{ mol HCO}_3^-$ , adecuada para mantener un pH de 6,8), se recomiendan distintas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en la solución tampón:

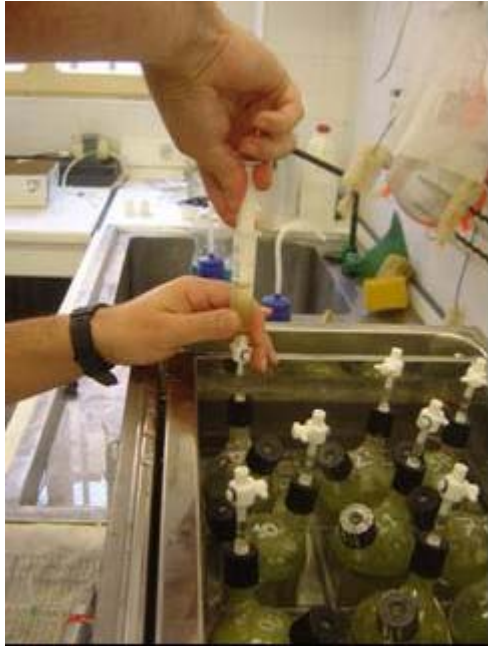
- pH 6,5: 18,3 g  $\text{Na HCO}_3$  + 1,9 g  $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$  ( $0,058 \text{ mol HCO}_3^-$ )
- pH 6,4: 14,0 g  $\text{Na HCO}_3$  + 1,5 g  $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$  ( $0,044 \text{ mol HCO}_3^-$ )
- pH 6,2: 9,3 g  $\text{Na HCO}_3$  + 1,0 g  $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$  ( $0,029 \text{ mol HCO}_3^-$ )
- pH 6,0: 5,7 g  $\text{Na HCO}_3$  + 0,6 g  $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$  ( $0,018 \text{ mol HCO}_3^-$ )

#### Estimación de la fermentación por determinación de la presión interna

#### Flujo de fase líquida

La simulación del flujo de líquido se realizará extrayendo a intervalos regulares, establecidos en función del ritmo de tránsito teórico, volúmenes conocidos de líquido a través de la válvula del filtro mediante una jeringa acoplada a su salida hembra, y posterior introducción por la misma vía del mismo volumen de solución de incubación (sin inóculo ruminal), mantenida a  $38^\circ\text{C}$  y en atmósfera de  $\text{CO}_2$ . La pauta diaria recomendada para programar la extracción de fase líquida es: durante las 12 primeras horas de incubación, cada 2 horas; durante las siguientes 12 horas, cada 4 horas.

#### Muestreo de la fase líquida



del periodo de incubación no sobrepase las 96 horas.

Para ampliar la información, efectuar consultas o pedidos, pueden dirigirse a la siguiente dirección:

Manuel Fondevila  
Depto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza.  
Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza (España)

(FAX: 34- 976 761590; e-mail: [mfonde@unizar.es](mailto:mfonde@unizar.es))

#### **Unidad de incubación con bolsas de nylon con material sólido en el interior**

El medio líquido de incubación extraído puede emplearse a voluntad, tomando muestras para la determinación de los parámetros que se consideren interesantes o conservando todo el volumen agrupado para análisis conjuntos.

#### *Flujo de fase sólida*

Si, además de los parámetros ya considerados, el objetivo de la investigación exige considerar también el tránsito de la fase sólida para simular las condiciones ambientales de fermentación ruminal, se recomienda envasar el sustrato sólido en bolsas de nylon de 150  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, selladas térmicamente y provistas de un hilo de nylon para permitir su manipulación. Estas bolsas pueden ser introducidas y extraídas secuencialmente de las unidades de fermentación, simulando el ritmo de tránsito de la fase sólida. En este caso, se recomienda mantener el sistema en acostumbramiento (con extracción del gas producido, flujo de fase líquida e intercambio de bolsas de material sólido) durante al menos 24 horas, antes de comenzar el periodo de extracción de muestras. Se recomienda que la duración total



**La presente patente es propiedad de la Universidad de Zaragoza, que se reserva todos los derechos**