

PROTEOLISIS EN LOS ENSILADOS Y SU VALORACION

Por M.^a E. de la Concha Vázquez (1)
M.^a C. Carpintero Gigosos (2)

II. Experimentos «in vitro» del metabolismo del nitrógeno en el rumen. Estudio de la lisina asimilable.

INTRODUCCION

El metabolismo del nitrógeno en el rumen se caracteriza fundamentalmente por la velocidad de la proteólisis, la cantidad de proteína microbiana sintetizada y cantidad de proteínas intactas que pasan por el rumen sin degradar.

Es frecuente aprovechar la capacidad de síntesis de las bacterias del rumen, y aún siendo la proteína microbiana formada de buena calidad, no cubre los requerimientos de producción y rendimiento del animal, y por lo tanto sería ventajoso proteger las proteínas de la dieta de su desdoblamiento en el rumen, sin que esta protección afecte su posterior digestibilidad en el intestino, así como mejorar las condiciones de la conversión del amoníaco con miras a lograr una mayor tasa de síntesis de proteína.

La forma más frecuente de proteger estas proteínas de su degradación en el rumen es tratándolas químicamente para reducir su solubilidad.

Hasta ahora la utilización de conservadores en los ensilados se orientaba solamente hacia una mejora de la fermentación y una conservación de su proteína. Actualmente, el interés se centra en que el conservador actúe además protegiendo esta proteína de su degradación en el rumen.

El análisis de aminoácidos como método de predecir el valor nutritivo de una proteína, no siempre se ha correspondido con los valores reales obtenidos. Los procesos a que puede haberse sometido esta proteína puede hacer dudosa la interpretación de los resultados obtenidos, al obtenerse un valor total de aminoácidos más alto que el que corresponde a su valor nutritivo.

En este sentido se ha orientado este trabajo.

(1) Dpto. de Producción Animal.

(2) Estación Agrícola Experimental del C.S.I.C. León.

MATERIAL Y METODOS

La digestibilidad de la proteína en los ensilados ha sido medida combinando el procedimiento «in sacco» con un estudio «in vitro» en el laboratorio.

El esquema seguido es, en esencia, análogo al procedimiento «in vitro» de Tilley y Terry¹², para medir la digestibilidad de la materia seca de los forrajes. En el método seguido por estos autores, la muestra en una primera fase es digerida en líquido ruminal, y posteriormente, el residuo indigestible es incubado con pepsina ácida. La digestibilidad del forraje se calcula a partir de la materia seca inicial y el material indigestible final. Este esquema es el que hemos seguido para medir la digestibilidad de la proteína.

a) Degradación en líquido normal

Una forma de medir la degradabilidad de la proteína «in vitro», teniendo en cuenta la actividad proteolítica del rumen, es incubar las muestras en el laboratorio con líquido ruminal. Hay dos sistemas posibles: continuo y discontinuo. En el primero los productos formados en el fermentador se van eliminando a medida que se producen, mientras que en el segundo permanecen en él. Este procedimiento discontinuo, por su simplicidad, es el que hemos adoptado.

Las muestras utilizadas para todos estos estudios «in vitro» procedían de los ensilados de los trabajos de la parte I. La muestra liofilizada fue molida a un tamaño máximo de partícula de 1 milímetro.

Se pesaron 0.5 gramos de muestra seca media para cada tipo de ensilado, por cuadruplicado, en bolsas de nylon de un tamaño interior de 5 x 6 cm. aproximadamente. Las bolsas fueron cerradas con una doble costura y suspendidas mediante hilo, también de nylon, en tubos de centrífuga de 11 x 3,5 cm. provistos de una válvula de bunsen. Para evitar que las bolsas flotasen en el líquido ruminal, se colocó un contrapeso en el fondo de cada bolsa.

El líquido ruminal fue preparado mezclando por cada 40 mililitros de saliva artificial McDougall 10 mililitros de líquido ruminal, extraído de ovejas fistuladas 2.5 horas después de haber comido heno de alfalfa. De esta mezcla, una vez gaseada con CO₂, se añadieron 50 mililitros a cada tubo. Estos tubos, con las muestras y el líquido ruminal, se colocaron en una estufa a temperatura constante (39 ± 1°C) durante 48 horas.

Al finalizar este periodo de tiempo, las bolsas fueron sacadas de los tubos y sumergidas en agua corriente durante diez minutos para eliminar las fracciones solubles de nitrógeno. Dos de las bolsas, de cada tratamiento, se secaron a temperatura ambiente y con las otras dos se siguió el tratamiento posterior.

El contenido en nitrógeno no degradado en el rumen de las bolsas secas fue determinado por el método de Kjeldahl.

b) Digestibilidad en la pepsina/HCL

La digestibilidad de la proteína en pepsina ácida fue determinada incubando las bolsas que contenían el N-no degradado en el rumen, en tubos iguales a los utilizados en el caso anterior. Se añadieron a cada tubo 50 ml. de pepsina (1:10.000) al 0.1% en ácido clorhídrico 0.1 N. Estos tubos se colocaron en una estufa a 39°C durante 48 horas.

Finalizado este proceso las bolsas fueron extraídas, lavadas en agua corriente y el

N-no digerido fue determinado por el método de Kjeldahl de igual forma que en el caso del rumen.

En cuanto respecta al estudio de lisina asimilable hay que decir que existen varios métodos químicos para determinar estas unidades que son el residuo de lisina en el cual el grupo -amino está libre⁴. El método que aquí hemos utilizado es el de Kaka-de⁶, en el que el ácido trinitro-bencesulfónico reacciona con los grupos amino libres de proteínas para formar trinitrofenilderivados. La concentración de -TN-fenil-lisina fue determinada espectrofotométricamente a 346 mμ de longitud de onda.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados encontrados en el estudio de la digestibilidad de la proteína de ensilados de gramíneas y leguminosas sin conservador, se dan en la tabla I.

Los ensilados los henos, son los productos empleados en la alimentación animal que contienen proteínas de nivel más alto de digestibilidad en el rumen, 50-90% del N.T.^{9, 10}. Estos valores varían naturalmente según los distintos procedimientos de medida utilizados.

En los ensilados sin conservador los valores de la degradabilidad del nitrógeno medidos «in vitro» en bolsas de nylon suspendidas en el líquido ruminal, oscilan entre 40 y 75% del N-insoluble para la alfalfa y el trébol blanco, respectivamente en los ensilados de leguminosas. Este intervalo va desde un 68 para la festuca a un 72% para el dactilo en los ensilados de gramíneas.

En el ensilado de alfalfa la degradabilidad referida al N-total es de 87%, mientras que sólo es del 40% la referida al N-proteico. En el proceso fermentativo de este ensilado una parte considerable de la proteína total ha pasado a formas de nitrógeno soluble, y el N-proteico mostró resistencia a su degradabilidad en el rumen. Hemos preferido expresar los resultados en % de la proteína verdadera, en lugar de referirlos al N-total de la muestra, ya que siempre partimos de muestras de ensilados donde la proteína ha sido protegida y por ello nos parece más representativo tomar ésta como referencia.

La proteína en los ensilados de trébol violeta, aunque se conservó mejor en el silo, resultó ser menos degradada en el rumen que la procedente de los ensilados de trébol blanco. Existió menos variabilidad entre los valores de la proteína no degradable de las gramíneas (de 68 a 72%).

La digestibilidad de esta proteína no degradada en el rumen fue medida en pepsina ácida. Los valores encontrados para los dos ensilados de trébol son prácticamente iguales, 10% para el trébol blanco y 12% para el trébol violeta, aunque en este último el N-digestible final dio valor de 24% frente al 15% del trébol blanco. En el caso de la alfalfa, la proteína no degradada en el rumen fue digerida en pepsina más eficazmente que la de los tréboles y la fracción de N-indigestible resultó del mismo orden que en el trébol violeta.

La digestibilidad en pepsina, de la proteína no degradable de los ensilados de gramíneas, está comprendida entre un 13% y un 16% y los valores de N-indigestible son prácticamente iguales para las diferentes especies.

La tabla II muestra los resultados obtenidos al estudiar la digestibilidad «in vitro» de la proteína, en ensilados de una gramínea y una leguminosa conservadas con diferentes aditivos.

Al determinar la digestibilidad de muestras de ensilados conservados con diferentes

aditivos, estamos midiendo la digestibilidad de proteínas protegidas por el mismo aditivo utilizado al ensilar.

En los ensilados de gramíneas partimos, para medir la digestibilidad «in vitro», de una proteína eficazmente protegida ($P < 0.01$) por el formaldehído o el calor a 110°C en combinación con el ácido fórmico. La degradabilidad en el líquido ruminal de esta proteína conservada con formaldehído fue considerablemente menor, pasando de un valor de 75% en los silos conservados con ácido fórmico a un 46% en los protegidos, además, con formaldehído. El efecto de protección del calor a 110°C del ensilado con ácido fórmico + calor, no se tradujo, sin embargo en una protección en el rumen (86% de degradabilidad). El tratamiento con calor insolubilizó la proteína ($P < 0.05$) en el silo pero no evitó su degradación en el rumen a 55°C , aunque sí tuvo un pequeño efecto en el tratamiento a 110°C (74%).

La proteína no degradable en el rumen, por el efecto protector del formaldehído utilizado al ensilar, fue digerida un 43% en pepsina-ácida sin que se observen pérdidas excesivamente altas de N-indigestible. La protegida solamente por el calor a 110°C fue también digerida a un 24% y sólo un 2% aparece como N-indigestible.

En los ensilados de leguminosas partimos igualmente de proteínas eficazmente protegidas ($P < 0.05$) por el formaldehído y el calor a 110°C frente al resto de los tratamientos. Cuando medimos su degradabilidad en el líquido ruminal, el efecto de protección fue muy elevado para el tratamiento con formaldehído (31%) y el calor a 110°C (39%) frente a un 76% de degradabilidad en el caso del ensilado conservado con el ácido fórmico solamente. Esta degradabilidad fue también muy baja (28%) cuando el calor era el único tratamiento y a la temperatura más elevada (110°C).

La digestibilidad en pepsina ácida de estas proteínas no degradadas en el rumen, fue muy alta para los tratamientos con formaldehído (47%) y el calor a 110°C (42%). Las protegidas solamente por el calor a 110°C , fueron también en gran parte, digeridas (35%) aunque un posible efecto nocivo del calor se manifiesta por el alto contenido en N-indigestible.

En general se observó que el N-indigestible de las leguminosas fue siempre superior al de las gramíneas.

El efecto positivo del formaldehído en la protección de la proteína en cuanto a su degradación en el rumen, ha sido confirmado recientemente por varios autores^{1, 5, 11}. Las uniones resistentes que el formaldehído forma con la proteína son poco degradadas en el rumen del animal, pero pueden ser hidrolizadas posteriormente en pepsina-ácida y representarían proteína digestible en el intestino.

Un incremento en la dosis de formaldehído puede dar lugar a una superprotección y a afectar negativamente no sólo la ingestión por el animal, sino también su digestibilidad. Wilkinson⁷, propone utilizar en la preparación de los ensilados, dosis de 3 a 5 gramos/100 gramos de proteína como adecuadas para que no se produzcan efectos nocivos, y Arnould² recomienda la utilización conjunta de ácido fórmico y formaldehído en dosis de 2 a 3 gramos/100 gramos de P.B. en el que el papel del ácido sería favorecer la fermentación del ensilado y el del formaldehído, a estos niveles, prácticamente sólo proteger la proteína.

El efecto del calor es análogo al del formaldehído, y cuando la temperatura es excesiva, insolubiliza la proteína en el rumen, pero puede producir una reducción de la digestión enzimática y aumentar el N-fecal. En estos experimentos existen indicios de que el efecto del calor sólo y cuando la temperatura llegó a 110°C en los ensilados de leguminosas fue el responsable de que el N-indigestible fuese tan alto.

En el estudio de la lisina asimilable, los resultados obtenidos vienen dados en las tablas III y IV. Los contenidos en lisina asimilable de los ensilados de leguminosas sin

conservador estudiados por nosotros son más bajos ($P < 0.01$) que en los de gramíneas.

La protección de la proteína producida por el formaldehído y especialmente por el calor, es contrarrestada algunas veces por una disminución en la digestibilidad y valor biológico de algunos aminoácidos. La lisina puede ser uno de los más afectados.

En los ensilados conservados con ácido fórmico + calor a 110°C (tabla III), el contenido de lisina fue reducido considerablemente ($P < 0.01$) con respecto al resto de los tratamientos, tanto en leguminosas como en las gramíneas. El calor solo no ha tenido efecto en la reducción de la lisina asimilable como se esperaba, lo que nos induce a pensar que serán necesarios posteriores estudios aclaratorios.

El hecho de que la proteína pase a través del rumen sin degradarse y llegue al intestino, no siempre indica necesariamente que ésta es suficientemente digerida y que suministre el adecuado nivel de aminoácidos necesarios para nuevas síntesis proteicas por el animal. La absorción del aminoácido lisina disminuyó al aumentar las dosis de formaldehído en estudios realizados sobre la absorción de aminoácidos en el intestino de ovejas, utilizando isótopos radiactivos como marcadores de estas proteínas³.

RESUMEN

Los estudios «in vitro» para evaluar la calidad de la proteína se realizaron sobre muestras de ensilados sin conservador de cuatro gramíneas (dactilo, festuca, ray-grass inglés y ray-grass italiano) y tres de leguminosas (alfalfa, trébol blanco y trébol violeta) y de ensilado de ray-grass italiano y trébol violeta conservados con diferentes aditivos procedentes del trabajo de la parte I.

La proteína por efecto del formaldehído fue protegida de su degradación en el líquido ruminal, siendo esta reducción del 29% en el ensilado de ray-grass italiano y de un 45% en el de trébol violeta. La digestibilidad enzimática posterior aumentó en un 40% en el caso de ensilado de la gramínea y en un 37% en el de la leguminosa.

El ácido fórmico y calor (a 110°C) en el ensilado de gramínea no protegió la proteína de su degradación obteniéndose una degradabilidad del 86% mientras que en la leguminosa sí tuvo un efecto positivo reduciéndose su degradabilidad posterior en pepsina en un 32% respecto al tratamiento testigo.

El calor utilizado sin otro aditivo produjo una superprotección de la proteína incrementándose el N-indigestible final.

Sobre los mismos ensilados en los que se realizaron los estudios «in vitro» se analizó el contenido en lisina asimilable, siendo ésta significativamente más baja ($P < 0.01$) en los tratamientos con ácido fórmico y formaldehído y ácido fórmico y calor (a 110°C) que en el resto de los tratamientos tanto en la leguminosa como en la gramínea.

TABLA I
Digestibilidad «in vitro» de la proteína en muestras de ensilados sin conservador

ENSILADO	DIGESTIBILIDAD						
	Líquido ruminal		Pepsina		N-indigesti.		
	N-no degradada (% M.S.)	Dig. N (% N-Insol)	N-no digerida (% MS)	Dig. N (% N-Insol)	% NI	% NI	
LEGUMINOSAS							
Alfalfa	0.633	0.380	40.0	0.180	31.6	28.4	6.1
T. blanco	1.838	0.460	75.0	0.270	10.3	14.7	7.1
T. violeta	1.584	0.570	64.0	0.380	12.0	24.0	13.5
GRAMINEAS							
Dactilo	1.272	0.375	70.5	0.180	15.3	14.2	8.8
Festuca	1.146	0.370	68.0	0.190	15.7	16.6	11.2
R. inglés	1.190	0.340	71.4	0.190	12.6	15.9	11.1
R. italiano	1.301	0.400	69.3	0.220	13.8	16.9	12.4

TABLA II
Influencia del conservador sobre la digestibilidad «in vitro» de la proteína de los ensilados

Tratamientos	DIGESTIBILIDAD						
	Líquido ruminal		Pepsina		N-indigesti.		
	N-Insol (% MS)	N-no degradada (% M.S.)	Dig. N (% N-Insol)	N-no digerida (% MS)	Dig. N (% N-Insol)	% NI	% NI
GRAMINEA Ray-grass italiano							
Ac. fórmico	1.092 ^b	0.269	75.4	0.222	4.3	20.3	8.6
Ac. fórmico+formalina	1.763 ^a	0.954	45.9	0.199	42.8	11.3	7.5
Ac. fórmico+calor 55°C	1.641 ^b	0.241	85.3	0.162	4.8	9.9	6.7
Ac. fórmico+calor 110°C	2.244 ^a	0.315	86.0	0.153	7.2	6.8	5.1
Calor 55°C	1.646 ^b	0.278	83.1	0.120	9.6	7.3	4.9
Calor 110°C	1.397 ^b	0.370	73.5	0.031	24.3	2.2	1.2
LEGUMINOSA Trébol violeta							
Ac. fórmico	2.086 ^d	0.500	76.0	0.287	10.2	13.8	9.0
Ac. fórmico+formalina	2.402 ^e	1.658	31.0	0.523	47.2	21.7	17.2
Ac. fórmico+calor 55°C	2.048 ^d	0.482	76.5	0.454	1.4	22.1	14.4
Ac. fórmico+calor 110°C	2.402 ^e	1.472	38.7	0.463	42.0	19.3	14.4
Calor 55°C	1.984 ^d	0.639	67.8	0.440	10.0	22.2	13.9
Calor 110°C	2.170 ^d	1.565	27.9	0.801	35.2	36.9	24.4

a, b . Valores con diferentes subíndices en una columna, para cada especie, difieren significativamente (P<0.01)
e, g . Valores con diferentes subíndices en una columna, para cada especie, difieren significativamente (P<0.05)

TABLA III
Contenido en lisina asimilable de ensilados sin conservador

Tipo de muestra	g lisina asimilable / 100 g. proteína
Alfalfa	0.977 ^b
Trébol blanco	0.464 ^a
Trébol violeta	0.681 ^a
Dactilo	1.020 ^c
Festuca	1.212 ^c
Ray-grass inglés	1.607 ^h
Ray-grass italiano	1.305 ^d

a, b, c, d, h, valores con diferentes subíndices en la columna difieren significativamente - - (P<0.01).

TABLA IV
Efecto de los conservadores en el contenido en lisina asimilable de ensilados

Tratamientos	g lisina asimilable/ /100 g proteina
<u>GRAMINEA</u>	
Acido fórmico	1.217 ^a
Acido fórmico+formalina	0.643 ^b
Acido fórmico+calor 55º C	0.875 ^a
Acido fórmico+calor 110º C	0.627 ^b
Calor 55º C	0.836 ^a
Calor 110º C	0.998 ^a
<u>LEGUMINOSA</u>	
Acido fórmico	0.698 ^a
Acido fórmico+formalina	0.490 ^b
Acido fórmico+calor 55º C	0.725 ^a
Acido fórmico+calor 110º C	0.593 ^b
Calor 55º C	0.760 ^a
Calor 110º C	0.702 ^a

PROTEIN BREAKDOWN IN SILAGES TO PREDICT THE NUTRITIVE VALUE OF SILAGES

II. Nitrogen metabolism in the rumen by «in vitro» study. Available lysine studies.

SUMMARY

The aim this work was to evaluate the protein quality of several silages by «in vitro» study.

This work contain two different parts: on one hand we study the protein degradability and digestibility of 7 types of silage conserved without additives. The silages were made from 3 legumes (*Medicago sativa*, var. Europa, *Trifolium repens*, var. California ladina, *Trifolium pratense*, var. Páramo) and 4 grass (*Dactylis glomerata*, var. Lana Roskilde, *Festuca arundinacea*, var. Raba, *Lolium perenne*, var. Belida and *Lolium multiflorum*, var Sabalan).

On the other hand we study the effect of same additives from the ruminal part I, on 2 types of silages, one grass, italian ryegrass and one legume red clover.

The effect of the formaldehyde was to protect the protein from the ruminal degradation. This reduction was about 29% on the ryegrass and about 45% on the red clover silage.

The digestibility on pepsin was increased by the effect of the formaldehyde about 40% on the grass and 37% on the leguminous silage.

The formic acid and heat treatment did not have any protection effect on the grass silage protein, being the degradability of the protein about 86% whereas on the leguminous silage this treatment had a positive effect reducing the degradability at the rate of 37% and increasing the ulterior digestibility on pepsin about 32% compared with the control silage.

The effect of heat treatment, used without any other additive, was the superprotection of the protein increasing the final indigestible nitrogen.

The available lysine contain was also estimated on the same silages from «in vitro» study. It was significantly lower ($P < 0.01$) with the formic acid and formaldehyde treatment as well as the treatment of formic acid and heat compared with the rest of the treatments.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AMOS, H.E. (1980). Treatment of proteins to improve utilization by ruminants. *Proc. of the Georgia Nutr. Conf. for the Feed Industry*, 169-188.
- 2) ARNOULD, R. y col. (1978). Le formaldehyde utilisé comme conservateur d'ensilage sur les fermentations au niveau du rumen chez le mouton. *Rev. de l'Agric.*, 31(3), 499-513.
- 3) ASHES, J.R.; MANGAN, J.L.; SIDHU, G.S. (1984). Nutritional availability of amino acids from protein cross-linked to protect against degradation in the rumen. *Brit. J. Nutr.*, 52(2), 239-247.

- 4) CARPENTER, K.J. y BOOTH, V.H. (1973). Damage to lysine in food processing: its measurement and its significance. *Nutr. Abstr. and Reviews*, 43 (6), 423-450.
- 5) KAISER, A.G.; OSBOURN, D.F. y ENGLAND, P. (1982). Intake and digestion of formaldehyde treated red clover silages offered to calves either alone or with a urea supplement. *J. Agric. Sci. Camb.* 98 (2), 357-369.
- 6) KAKADE, M.I. y LIENER, I.E. (1969). Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 27, 273-280.
- 7) KILKINSON, J.M. y col. (1976). Acidity and proteolysis as factors affecting the nutritive value of corn silage. *J. Anim. Sci.* 42 (1), 208-218.
- 8) MCDUGALL, E.L. (1948). Studies of ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.
- 9) ØRSKOV, E.R. y MEHREZ, A.Z. (1977). Estimation of extent of protein degradation from basal feeds in the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Sc.*, 36, 78A.
- 10) SATTER, L.R. (1978). Protein solubility and degradability. What do they mean for ruminants? *Florida Nutr. Conf.* 95.
- 11) SIDONS, R.C. y col. (1984). The effect of formaldehyde or glutaraldehyde application to lucerne before ensiling on silage fermentation and silage N digestion in sheep. *Br. J. Nutr.*, 52 (2), 391-401.
- 12) TILLEY, J.M. y TERRY, R.A. (1963). A two stage technique for the «in vitro» digestion of forage crops. *J. Br. Grassld. Soc.*, 18, 104-111.

PROTEOLISIS EN LOS ENSILADOS Y SU VALORACION

Por M.^a C. Carpintero Gigosos (1)
M.^a E. de la Concha Vázquez (2)

III. Metabolismo del ensilado de alfalfa en el rumen. Experimentos «in vivo»

INTRODUCCION

En los rumiantes el proceso de la fermentación ruminal precede al de la digestión gástrica. En él se utilizan como sustratos tanto los componentes estructurales del forraje como los formados en la fermentación sufrida durante el proceso de ensilaje. Así, las proteínas, carbohidratos y todos los demás sustratos fermentables serán convertidos simultáneamente a ácidos grasos volátiles (A.G.V.), metano, dióxido de carbono, amoniaco y proteína microbiana.

La producción de amoniaco en el rumen se relaciona con la utilización de la proteína en la dieta^{2, 15}. Cuando ésta tiene como base el ensilado conservado con diferentes aditivos, el grado de proteolisis en el silo y la proteína protegida obtenida va a modificar el ritmo de fermentación de ésta en el rumen del animal, así como su grado de utilización.

La formación en el ensilado de ácidos grasos volátiles y su concentración, puede ser modificada por la utilización de un conservador adecuado. En el rumen del animal alimentado con estos ensilados la degradación de los carbohidratos a ácidos, y sus re-conversiones metabólicas, pueden originar una relación de concentración acético-propiónico más adecuada desde el punto de vista nutricional de estos ensilados.

En este trabajo se pretende conocer el metabolismo ruminal de ensilados de alfalfa y el efecto de los conservadores utilizados en ellos.

(1) Estación Agrícola Experimental del C.S.I.C. León.
(2) Departamento de Producción Animal.