

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE HARINA DE GIRASOL CON ÁCIDO MÁLICO Y CALOR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO Y FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Vanegas, J. L., Carro, M. D., Alvir, M.D. y González, J.

Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España. javier.gonzalez@upm.es

INTRODUCCIÓN

La baja eficiencia de utilización de la proteína por los animales rumiantes puede mejorarse reduciendo la degradación ruminal de las proteínas mediante diferentes tratamientos, entre los que destacan por su eficacia los tratamientos con calor y con ácidos. En algunos estudios anteriores (Arroyo *et al.*, 2011, 2013) se ha comparado la eficacia de diferentes ácidos como protectores de la proteína de la harina de girasol y se ha observado una mayor efectividad del ácido málico frente a otros ácidos. Por otra parte, diferentes trabajos han constatado la eficacia del ácido málico como aditivo para estimular la fermentación ruminal de diferentes alimentos y reducir la producción de metano (CH₄) (Carro *et al.*, 1999; Carro y Ranilla, 2003). Sin embargo, no existen estudios que hayan analizado conjuntamente ambos efectos del tratamiento con ácido málico. Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto del tratamiento de la harina de girasol con ácido málico y calor sobre la producción de CH₄ y la concentración de NH₃-N (como parámetro indicativo de la degradación proteica) durante la fermentación ruminal *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del experimento se utilizó harina de girasol (HG) molida a través de una criba de 1 mm de paso. Parte de la muestra utilizada se pulverizó con una solución 1M de ácido málico (400 ml/kg) y se introdujo en una estufa a 150°C durante 1 (HG1) o 3 horas (HG3). La composición química de las tres muestras obtenidas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química¹ (g/kg materia seca) de los alimentos empleados

Harina de girasol	MO	PB	FND	FAD	LAD	NIND	NIAD
Sin tratar	927	359	490	275	88,2	89,8	17,5
Tratada con ácido málico a 150 °C 1 hora	932	337	466	261	84,5	98,3	16,5
Tratada con ácido málico a 150 °C 3 horas	930	343	633	275	110	246	46,8

¹MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; NIND: nitrógeno insoluble en solución neutro detergente; NIAD: nitrógeno insoluble en solución ácido detergente.

Cada una de las muestras se fermentó *in vitro* con líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas que recibían una dieta compuesta por heno de alfalfa y concentrado en proporción 2:1 administrada en dos partes iguales a las 09:00 y 17:00 h. Las incubaciones *in vitro* se llevaron a cabo en viales de vidrio (115 ml) en los que se pesaron 300 mg de materia seca de las tres muestras. El contenido ruminal extraído de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa y se trasladó inmediatamente al laboratorio. Como medio de cultivo se utilizó una modificación del medio descrito por Goering y Van Soest (1970), que consistió en la sustitución de (NH₄)HCO₃ por NaHCO₃ y la no inclusión de tripticasa para que el medio no aportase N. El fluido ruminal se mezcló con el medio de cultivo en una relación 1:4 (vol/vol) a 39 °C bajo gaseado continuo con CO₂, dosificándose 30 ml de la mezcla en cada vial mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31).

Para cada muestra e inóculo se utilizaron dos viales, que se cerraron herméticamente y se incubaron a 39 °C durante 16,5 horas (equivalente a una velocidad de paso a través del rumen de 0,060/h). Adicionalmente se incluyeron viales sin sustrato (blancos; 2 por inóculo) para corregir por la producción de gas procedente del inóculo. Las incubaciones se realizaron utilizando el inóculo de cada oveja por separado, para obtener cuatro réplicas por tratamiento.

Al finalizar la incubación, en cada vial se midió la presión y el volumen de gas producido y se tomó una muestra (15 ml) para analizar su contenido en metano (CH₄). Tras medir el pH del contenido de los viales se tomaron muestras para el análisis de su concentración en nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y ácidos grasos volátiles (AGV) siguiendo los procedimientos descritos por Martínez *et al.* (2010). Finalmente, el contenido de cada vial se filtró a través de crisoles provistos de una placa porosa, los cuales se secaron en estufa (100 °C; 48 h) y se pesaron. Posteriormente, uno de los crisoles de cada tratamiento se calcinó (503 °C; 6 h) para determinar la desaparición de materia orgánica (DMO) y en el otro se analizó el contenido en fibra neutro detergente del residuo para determinar la degradabilidad de la fibra (DFND) de la muestra incubada. La cantidad de materia orgánica fermentada (MOF) en cada vial se calculó a partir de la producción de AGV según la fórmula propuesta por Demeyer (1991).

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza, utilizando un modelo mixto en el que el tratamiento se consideró un efecto fijo y el inóculo (oveja donante) se consideró un efecto aleatorio. Cuando se detectó un efecto significativo del tratamiento ($P < 0,05$), las diferencias entre medias se analizaron mediante el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, se produjeron cambios en la composición de la harina de girasol con los tratamientos de protección, destacando en especial los fuertes incrementos en fibra neutro detergente (FND), lignina y N asociado a las fracciones de fibra al aplicar calor durante 3 h, pero no se apreciaron cambios de importancia al aplicar éste durante 1 h.

Los dos tratamientos redujeron la producción de CH₄, la proporción de CH₄ en el gas producido y la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) en comparación con la la harina de girasol sin tratar ($P < 0,05$; Tabla 2). Sin embargo, mientras que el tratamiento HG3 redujo la producción de gas y AGV, la MOF, la DMO y la DFND con respecto a la harina de girasol sin tratar ($P < 0,05$), no existieron diferencias entre HG y HG1 en estos parámetros ($P > 0,05$).

Tabla 2. Fermentación ruminal in vitro (16,5 h) de los tres sustratos experimentales¹

Item	HG	HG1	HG3	eem ²	P-valor
Producción de gas (µmol)	2173 ^b	2240 ^b	1578 ^a	15,2	<0,001
Producción de CH ₄ (µmol)	320 ^c	284 ^b	178 ^a	6,81	<0,001
% de CH ₄ en el gas	14,8 ^c	12,7 ^b	11,2 ^a	0,353	0,001
NH ₃ -N (mg/l)	303 ^c	259 ^b	147 ^a	5,07	<0,001
Total ácidos grasos volátiles (µmol)	1120 ^b	1276 ^b	756 ^a	26,0	<0,001
Acético/Propiónico (mol/mol)	3,61 ^b	2,96 ^a	3,69 ^b	0,069	<0,001
CH ₄ /AGV (mol/mol)	0,262 ^b	0,224 ^a	0,232 ^a	0,0078	0,029
MOF ³ (mg)	99,6 ^b	104,7 ^b	62,4 ^a	2,19	<0,001
DMO ⁴ (%)	37,3 ^b	35,7 ^b	18,8 ^a	1,88	<0,001
DFND (%)	25,9 ^c	18,9 ^b	4,3 ^a	1,94	<0,001

¹Harina de girasol sin tratar (HG) o tratada con una solución 1M de ácido málico (400 ml/kg muestra) a 150 °C durante 1 (HG1) o 3 h (HG3); ²error estándar de la media; ³materia orgánica fermentada estimada; ⁴desaparición de materia orgánica; ⁵ desaparición de la fibra neutro detergente.

^{a, b, c} en la misma fila, los valores con diferente letra difieren ($P < 0,05$)

La aplicación de calor a alimentos húmedos da lugar a reacciones de condensación entre grupos aminos libres de las proteínas y grupos ácidos de los alimentos que provocan aumentos analíticos en las fracciones de la pared celular y el N asociado a ésta y que se

incrementan con la intensidad del tratamiento (Pereira *et al.*, 1998). Cuando se produce un sobrecalentamiento, esta condensación da lugar a productos de Maillard que son indigestibles, como podría haber ocurrido en el tratamiento HG3. El tratamiento conjunto con ácido málico y calor de la harina de girasol ha demostrado ser eficaz para la protección de sus proteínas frente a la degradación ruminal (Arroyo *et al.*, 2011, 2013), lo que concuerda con la menor ($P<0,05$) concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ observada en este trabajo para HG1 y HG3 comparada con HG. La evolución similar de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ y el CH_4 producido observada en las tres muestras podría indicar que la reducción de CH_4 fue debida, al menos parcialmente, a una menor disponibilidad para la microbiota de esqueletos carbonados resultantes de la degradación de proteínas y desaminación de sus aminoácidos.

Comparado con HG, el tratamiento HG1 provocó una reducción ($P<0,05$) en la relación acético/propiónico, debida a una mayor proporción de propiónico en el total de AGV producidos (21,8 y 18,4% en HG1 y HG, respectivamente). Esta modificación se debió a la incorporación de malato, que puede ser fermentado a propiónico por los microorganismos ruminales, como se ha demostrado en numerosos estudios (Carro *et al.*, 1999; Carro y Ranilla, 2003). Los dos tratamientos utilizados produjeron una reducción ($P<0,01$) de la DFND, lo que podría indicar una menor actividad fibrolítica debida a la simbiosis existente entre la flora fibrolítica y las arqueas metanogénicas (Bauchop y Mountford, 1981; Bernalier *et al.*, 1991), cuya actividad se vio reducida como muestra la menor producción de CH_4 .

En resumen, el tratamiento de la harina de girasol con ácido málico a 150 °C durante 1 h redujo la degradación de la proteína y la producción de CH_4 sin alterar la producción total de AGV ni la degradabilidad de la materia orgánica. Sin embargo, el mismo tratamiento aplicado durante 3 h afectó negativamente a la fermentación ruminal de la harina de girasol, evidenciando el importante efecto que puede tener la duración del tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arroyo, J. M. *et al.* 2011. Anim. 5: 1188-1194.
- Arroyo, J. M. *et al.* 2013. Anim. 7: 223-231.
- Bauchop, T. & Mounfort, D.O. 1981. Appl. Environ. Microbiol. 42: 1103-1110.
- Bernalier, A. *et al.* 1991. Anim. Feed Sci. Technol. 32: 131-136.
- Carro, M.D. *et al.* 1999. Anim. Feed Sci. Technol. 79: 279-288.
- Carro, M.D. & Ranilla, M.J. 2003. Br. J. Nutr. 89: 279-288.
- Demeyer, D. I. 1991. En: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. (Ed. JP Jouany) pp. 217-237. INRA Editions, Paris, Francia.
- Goering, M.K., & Van Soest, P.J. 1970. Agricultural Handbook, N°. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington DC.
- Martínez, M.E. *et al.* 2010. Anim. Feed Sci. Technol. 158: 126-135.
- Pereira, J. C. *et al.* 1998. Anim. Feed Sci. Technol. 74: 107-121.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos AGL2012-31064 (financiado por la CICYT) y MEDGAN ABI-2913 (financiado por la Comunidad de Madrid y cofinanciado con Fondos Estructurales de la UE).

INFLUENCE OF N SOURCE ON *IN VITRO* METHANE PRODUCTION

ABSTRACT: Incubations were carried out with batch cultures of ruminal micro-organisms to study the effects of the treatment of sunflower meal (SFM) with malic acid at 150 °C for 1 (SFM1) or 3 (SFM3) hours on *in vitro* fermentation. There were no differences ($P>0,05$) between SFM and SFM1 in the amount of gas and volatile fatty acids (VFA) produced and the disappearance of organic matter (OMD), but CH_4 and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations were reduced ($P<0,05$) by 11.3 and 14.5% with the malic treatment at 150 °C for 1 hour, respectively. In contrast, SFM3 treatment reduced when compared to SFM gas and VFA production and OMD by 27.4, 32.5 and 49.6 ($P<0,05$), respectively, indicating decreased fermentability of SFM. The results indicate that combining malic acid and heat treatment (150°C) for 1 h could be an effective means to reduce both protein degradability and CH_4 production, but increasing the length of the treatment to 3 h resulted in reductions of SFM degradability and VFA production.

Keywords: Protein protection, malic acid, heat, methane, *in vitro* fermentation