ESTIMACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE DISTINTAS FRACCIONES NITROGENADAS DE LA HIERBA EMPLEANDO TECNOLOGÍA NIRS[1]

S. Andrés[1], C. Valdés[1], R. García[1], F.J. Giráldez[2], A. Calleja[1]
[1]Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León
[2]Estación Agrícola Experimental. CSIC. Apartado 788, 24080 León

INTRODUCCIÓN

La calidad de los forrajes está condicionada, en parte, por su contenido de proteína bruta. Sin embargo, es preciso considerar que, dentro de la proteína bruta de los alimentos, existen distintas fracciones caracterizables analíticamente con diferentes cinéticas de degradación en el rumen (Van Soest, 1994). Así, el Sistema de Carbohidratos y Proteína Neta de Cornell (CNCPS; Sniffen *et al.*, 1992) divide la proteína bruta en tres fracciones: una fracción inmediatamente degradable (fracción A: compuestos nitrogenados de origen no proteico), una fracción no degradable e indigestible (fracción C: nitrógeno asociado a la lignina y la proteína dañada por tratamiento térmico) y, por último, una fracción denominada proteína verdadera (fracción B). Asimismo, el CNCPS subdivide la fracción B en tres subfracciones, B1, B2 y B3, de disponibilidad ruminal decreciente debido a que poseen distinto ritmo de degradación ruminal. No obstante, el fraccionamiento de la proteína según lo propuesto por el CNCPS requiere un procedimiento más complejo que la simple determinación del contenido en proteína bruta (PB), lo cual complica y encarece todo el proceso.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es conocer en qué medida es posible estimar adecuadamente mediante tecnología NIRS cada una de las fracciones propuestas por el CNCPS en muestras hierba obtenidas en prados de la montaña de León.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 46 muestras de hierba obtenidas en prados de la montaña de León. Inicialmente, las muestras se desecaron a 60°C en una estufa de aire forzado y se molieron en un molino de martillos tipo Culatti provisto de una malla con un tamaño de paso de 1 mm de diámetro.

Posteriormente se determinaron analíticamente los contenidos de las distintas fracciones de proteína bruta (PB) propuestas por el CNCPS (Sniffen *et al.*, 1992) siguiendo la metodología propuesta por Licitra *et al.* (1996). Así, la fracción A, que representa el nitrógeno de origen no proteico (NNP), se calcula restando al contenido total de N de la muestra el contenido de N del precipitado con ácido tricloroacético (TCA), que a su vez comprende las fracciones B+C; la fracción B, que representa el nitrógeno de origen proteico (NP, proteína verdadera), se calcula como el N precipitable en TCA (B+C) menos el N insoluble en detergente ácido (Fracción C); y, por último, la fracción C, que representa la fracción de N no disponible (no degradable e indigestible), es el N ligado a la fibra ácido detergente (NIDA). Para este trabajo, también se determinó la fracción B3, que representa el N insoluble en

[1] Proyectos ULE 2003-24 (Universidad de León) y "Efecto de la época de corte y de la fermentación mineral sobre el valor nutritivo de forrajes de la Montaña de León" (Diputación Provincial de León).

detergente neutro pero soluble en detergente ácido y que se calcula como el N ligado a la FND menos el N ligado a la FAD.

Los espectros se recogieron con un espectrofotómetro FOSS NIRSystem 6500 (Perstorp Analytical Inc.) utilizando dos cápsulas rectangulares por cada muestra con el fin de obtener un espectro promedio. Para seleccionar un conjunto de muestras representativo de la población total se utilizaron los programas CENTER y SELECT. A continuación, se trataron los espectros con SNV-D y se aplicaron derivadas con diferentes tamaños de gap y segmento de suavizado para corregir el efecto multiplicativo que se produce como consecuencia de las variaciones en la luz difusa. Las ecuaciones de calibración se crearon mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificada y se hicieron dos pases para eliminar muestras espurio. Finalmente, las calibraciones se validaron con las muestras restantes. En este trabajo sólo se presentan las calibraciones que aportaron los errores estándar de predicción más bajos. Se utilizó el programa ISI-NIRS2 versión 4.0 (Infrasoft International, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros no sólo recogen información relacionada con la composición química de las muestras, sino también con su estructura física, y puesto que cada una de las fracciones nitrogenadas ha de agrupar estructuras moleculares diferentes, es de esperar que la estimación de las fracciones nitrogenadas mediante tecnología NIRS pueda llevarse a cabo.

Tabla 1. Rango, media y desviación estándar de las distintas fracciones nitrogenadas para los grupos de muestras empleados en calibración y en validación

	Muestras de calibración (n=35)			Muestras de validación (n=11)		
Parámetro (% MS)	Rango	Media	DE	Rango	Media	DE
N total (PB)	1,6 - 2,7	2,2	0,30	1,9 - 2,7	2,2	0,22
NNP (Fracción A)	0,27 - 0,69	0,47	0,099	0,27 - 0,57	0,44	0,081
Fracción B+C	1,14 - 2,24	1,71	0,283	1,40 - 2,12	1,77	0,207
NP (B)	0,97 - 1,91	1,33	0,215	1,14 - 1,75	1,35	0,163
Fracción B3	0,49 - 1,19	0,77	0,154	0,70 - 1,00	0,82	0,091
NIDA (Fracción C)	0,11 - 0,75	0,37	0,144	0,23 - 0,59	0,41	0,106

Tabla 2. Estadísticos de las calibraciones creadas para estimar las distintas fracciones nitrogenadas

	n	p	EEC	R^2	EEVC	1-VR	EEP	RPD	RER
N total (PB)	33	6	0,039	0,983	0,058	0,962	0,035	6,29	22,86
NNP (A)	33	5	0,037	0,857	0,064	0,595	0,038	2,13	7,89
Fracción B+C	30	5	0,036	0,983	0,047	0,971	0,021	9,86	34,29
NP (B)	28	8	0,017	0,990	0,058	0,893	0,036	4,53	16,94
Fracción B3	31	4	0,042	0,911	0,062	0,803	0,040	2,28	7,50
NIDA (C)	30	6	0,025	0,971	0,052	0,872	0,023	4,61	15,65

n: número de muestras empleadas para crear la calibración; **p**: número de términos en la ecuación; **EEC**: error estándar de calibración; **R^2**: coeficiente de determinación para el procedimiento de calibración; **EEVC**: error estándar de validación cruzada; **1-VR**: coeficiente de determinación para el procedimiento de validación; **EEP**: error estándar de predicción; **RPD**: relación entre la desviación estándar del grupo de muestras de validación para cada parámetro y el error estándar de predicción; **RER**: relación entre el rango del método de referencia para el grupo de validación y el error estándar de predicción

De hecho, como puede observarse en la tabla 2, excepto para las fracciones A y B3 los estadísticos tanto de calibración como de validación son bastante aceptables, con valores de RPD y RER por encima de 3 y 10 respectivamente, lo cual es recomendable para el análisis de rutina según Williams y Sobering (1996). La estimación del contenido de nitrógeno total (PB) es muy buena para este tipo de muestras, lo cual coincide con lo ya señalado en numerosos trabajos (Hoffman *et al.*, 1999). Sin embargo, al igual que señalan otros autores (Hoffman *et al.*, 1999) no se entiende la razón por la cual la exactitud en la estimación del NNP es tan baja. Quizás la heterogeneidad de esta fracción nitrogenada, compuesta fundamentalmente por proporciones variables de péptidos y aminoácidos no esenciales (Van Soest, 1994) pueda ser una explicación. En cualquier caso, el hecho de eliminar esta fracción y estimar sólo el nitrógeno precipitable en ácido tricloroacético (B+C) proporcionó calibraciones con una exactitud superior a las obtenidas para el caso de la PB.

Por otra parte, el resto de fracciones (B, NIDN, B3, C) pudieron estimarse con una exactitud aceptable, aunque no en la medida en que lo fueron el nitrógeno total (PB) y la fracción B+C, probablemente porque la obtención de aquéllas requiere que, previamente al análisis Kjeldahl, se obtenga la FND en unos casos y la FAD en otros. Tanto la FND como la FAD son parámetros químicamente más complejos que la PB, por lo que se estiman con mayor dificultad mediante tecnología NIRS. Pero si además se pretende estimar el contenido en N de estas fracciones, encontramos una dificultad añadida. Esta explicación se ve reforzada por el hecho de que la fracción que peor se estima sea la B3, para cuyo cálculo requiere los dos análisis, FND y FAD. No obstante, la fracción C que, desde el punto de vista del valor nutritivo de los forrajes tiene un gran interés, ya que representa la fracción de N no digestible, pudo estimarse mediante tecnología NIRS con un grado de exactitud aceptable, lo cual coincide con lo ya señalado por De la Roza *et al.* (1998) con ensilados de maíz y hierba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE LA ROZA, B.; MARTÍNEZ, A.; SANTOS, B.; GONZÁLEZ, J.; GÓMEZ, G., 1998. The estimation of crude protein and dry matter degradability of maize and grass silages by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **6:** 145-151.

HOFFMAN, P.C.; BREHM, N.M.; COMBS, D.K.; BAUMAN, L.M.; PETERS, J.B.; UNDERSANDER, D.J., 1999. Predicting the effect of proteolysis on ruminal crude protein degradation of legume and grass silages using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* **82:** 756-763.

INFRASOFT INTERNATIONAL 1996. *Routine Operation, Calibration Development Manual. NIRS 2.* Version 4.00. Silver Spring, MD, USA.

LICITRA, G.; HERNÁNDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J., 1996. Standarization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **57**: 347-358.

SNIFFEN, C.J.; O´CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B., 1992. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* **70:** 3562-3577.

VAN SOEST, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd edn. Comell University Press. Ithaca (EEUU).

WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D., 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. En: Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. *Proceedings of the 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy,* Montreal, Canada (Eds. Davies, A.M.C. y Williams, P.C.), pp. 548-551. NIR Publications, Chichester, Reino Unido.