ITEA (2003), Vol. Extra N.º 24. Tomo II, 690-692

UTILIZACIÓN DE PROTEASA DE *STREPTOMYCES GRISEUS* PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LA PROTEÍNA DE PIENSOS COMPUESTOS Y MEZCLAS

F. Vicente, B. de la Roza, S. Modroño, A. Martínez, A. Argamentería
Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)
Apdo. 13; 33300 Villaviciosa (Asturias)

INTRODUCCIÓN

Los nuevos sistemas de valoración proteica de los alimentos consideran de importancia conocer la proporción de proteína degradable en el rumen. Con este fin, se ha venido utilizando tradicionalmente la técnica de incubación *in situ*. Ésta precisa mantener animales intervenidos quirúrgicamente, que necesitan períodos de adaptación a los ensayos, y tiene la limitación física de no poder valorar simultáneamente un elevado número de muestras, por lo que es poco viable para su aplicación rutinaria a gran escala. Para obviar este problema se han diseñado diferentes métodos enzimáticos para estimar la degradabilidad de la proteína (Stern *et al.*, 1997). Dichas técnicas presentan la ventaja de ser completamente independientes del efecto animal, precisan una menor cantidad de muestra y permiten valorar conjuntamente un elevado número de alimentos. Sin embargo, no todas ellas han sido validadas suficientemente con los resultados obtenidos en ensayos *in situ*.

Este trabajo estudia la posibilidad de predecir la degradabilidad efectiva de la proteína bruta de piensos compuestos y mezclas alimenticias, utilizados habitualmente en la Cornisa Cantábrica, a partir de los resultados obtenidos mediante su incubación con proteasa de *Streptomyces griseus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo con piensos compuestos (n=11) y mezclas alimenticias (n=8) utilizados frecuentemente por los ganaderos de la Cornisa Cantábrica en la alimentación del ganado vacuno lechero. La degradabilidad ruminal del nitrógeno se determinó en tres vacas frisonas, vacías y secas, canuladas en rumen que consumían una dieta basal fijada a nivel de mantenimiento, con una relación forraje:concentrado de 70:30 y suministrada en dos tomas diarias a las 8 y 14 horas. El concentrado utilizado para la alimentación de los animales durante los ensayos de degradabilidad era de características similares a los alimentos a valorar. Cinco gramos de muestra molida a 2 mm se pesaron en bolsas de nylon (50 µm de diámetro de poro) y fueron incubados en el rumen durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Los detalles del procedimiento de incubación se hallan descritos en de la Roza *et al.* (2001). La evolución de la desaparición de la proteína bruta se ajustó para cada animal según el modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979) mediante SAS (1990).

La técnica enzimática utilizada fue la propuesta por Aùfrere y Cartailler (1988) modificada por de la Roza *et al.* (1998). Se tomaron 250 mg de muestra molida a 0.75 mm de los mismos alimentos y fueron incubados durante 1 y 24 horas a 40ºC por duplicado con 1.5 mg de proteasa de *Streptomyces griseus* (Sigma P-5147) disueltos en 25 ml de tampón borato-fosfato (pH=8). Una mezcla de cloramfenicol y pimaricina (0.025 mg de cada uno) se añadió a cada tubo para anular el crecimiento microbiano. Al final de cada período de incubación, y tras centrifugación de los tubos

a 1100xg durante 5 minutos a 10ºC, se filtró el sobrenadante a través de papel Whatman nº54 determinándose su contenido en N-Kjeldhal. El nitrógeno degradado se calculó como el contenido en nitrógeno del filtrado divido por la concentración de nitrógeno del alimento original.

Las relaciones entre parámetros de degradabilidad *in situ* y solubilidades enzimáticas se establecieron mediante análisis de covarianza, considerando a estas últimas como covariables, las clases pienso y mezcla como factores de efecto fijo y la respectiva interacción (SAS, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de proteína bruta y fibra neutro detergente de los alimentos fueron, respectivamente, de 21.4%±0.78 y 20.6%±1.12 en los piensos y de 19.4%±0.80 y 18.8%±1.72 en las mezclas. Los parámetros de degradación y la degradabilidad efectiva considerando un ritmo fraccional de tránsito de 6%/h, así como los resultados de degradación enzimática, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Coeficientes de degradabilidad (a, b, c), degradabilidad efectiva (DE) y desaparición tras 1 (P1) y 24 horas (P24) de incubación con proteasa del nitrógeno de piensos compuestos (PC) y mezclas alimenticias (MZ). Todos los valores en %.

	n	a	b	c	DE	P1	P24
PC	11	40.00	59.14	9.48^{b}	76.16^{b}	35.08	58.10
MZ	8	35.25	62.82	7.51^{a}	69.87^{a}	38.95	59.71
e.e. (±)		1.779	2.140	0.300	0.766	1.885	1.550

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p<0.01$).
e.e. error estándar

No se apreciaron diferencias en la solubilidad (a) ni en la fracción potencialmente degradable (b) en ambos tipos de alimentos, mientras que el ritmo fraccional de degradación fue estadísticamente superior ($p<0.01$) en los piensos compuestos que en las mezclas (9.5 vs. 7.5% ±0.30). Como resultado de este mayor ritmo de degradación, la degradabilidad efectiva fue superior en los piensos compuestos (76.2 vs. 69.9% ±0.77 para piensos y mezclas respectivamente, $p<0.001$). La desaparición de proteína bruta tras la digestión enzimática con proteasa de *Streptomyces griseus* no se vio afectada por el tipo de alimento en ninguno de los dos períodos de incubación. Los resultados son inferiores a los aportados por Tománková y Kopečný (1995) para alimentos similares. Esta diferencia puede ser debida al efecto negativo del almidón sobre la acción de la proteasa, ya que estos autores realizaron una hidrólisis previa con amilasa para disminuir dicho efecto negativo. Assoumani *et al.* (1992) sugieren el uso de α-amilasa cuando el contenido de almidón de los alimentos en estudio supere el 23%. En nuestro caso, la proporción de almidón fue de 39.36%±1.793 y 28.79%±1.447 para piensos y mezclas respectivamente. Por otra parte, los relativos bajos valores de P24 respecto a P1 pueden ser debidos a que la acumulación de productos finales de la digestión durante la hidrólisis de la muestra puede inhibir progresivamente la actividad de la proteasa (Stern *et al.*, 1997).

En la tabla 2 se presentan las ecuaciones de predicción de la degradabilidad efectiva, estimada para unas tasas de flujo de 4%/h (DE4), 6%/h (DE6) y 8%/h (DE8), en función de la desaparición del nitrógeno tras incubación de piensos y mezclas con proteasa durante 1 (P1) y 24 (P24) horas. Con el modelo propuesto, no se apreció significación estadística de la interacción entre el tipo de alimento y la

covariable, por lo que dicha interacción se eliminó del modelo a fin de obtener una única pendiente (b) para ambos tipos de alimentos.

Tabla 2. Predicción (y=m+ix) de la degradabilidad efectiva calculada para tasas de flujo de 4%/h (DE4), 6%/h (DE6) y 8%/h (DE8) a partir de la desaparición de nitrógeno en la hidrólisis con proteasa de *Streptomyces griseus* durante 1 (P1) y 24 (P24) horas de piensos compuestos (PC) y mezclas alimenticias (MZ).

		P1					P24			
		n	m	i	R^2	RSD	m	i	R^2	RSD
DE8	PC	11	61.61	0.297	0.689	0.681	54.79	0.297	0.610	0.756
	MZ	8	53.83				47.68			
DE6	PC	11	68.26	0.225	0.658	0.657	62.95	0.227	0.599	0.701
	MZ	8	61.10				56.30			
DE4	PC	11	76.90	0.132	0.601	0.602	73.72	0.134	0.579	0.618
	MZ	8	70.88				67.90			

Las ecuaciones de predicción estimadas a partir de 1 hora de hidrólisis con proteasa presentan unos coeficientes de regresión superiores a los estimados tras 24 horas de incubación. Este descenso en la exactitud de la predicción cuando se incrementa el tiempo de incubación enzimática puede ser debido a la inhibición de la actividad de las proteasa con el tiempo de incubación como ya se ha mencionado anteriormente. En todo caso, la correlación entre los resultados *in situ* y con proteasa es similar a la obtenida por otros autores con las materias primas que entran a formar parte de los piensos y mezclas estudiados (Assoumani *et al.*, 1992). La ordenada en el origen es en todo momento superior en piensos que en mezclas, lo que podría ser un reflejo de la presencia de semilla entera de algodón en mezclas pero no en piensos. Para ambos períodos de hidrólisis, la exactitud de la predicción disminuye conforme se incrementa el tiempo de permanencia del alimento en el rumen, de modo que para un ritmo de tránsito del 4%/h, la desaparición del nitrógeno tras 1 hora de hidrólisis enzimática explica el 60% de la variación, mientras que para una k de 0.08 llegaría al 69%.

Los resultados de este trabajo indican que es posible predecir la degradabilidad efectiva en el rumen de piensos compuestos y mezclas alimenticias a partir de la desaparición del nitrógeno tras hidrolizar los alimentos durante 1 hora con proteasa de *Streptomyces griseus*. El incremento en el tiempo de hidrólisis enzimática hasta las 24 horas, sin la adición de amilasa, no mejora los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assoumani, M.B.; Vedeau, F.; Jacquot, L.; Sniffen, C.J. (1992). Anim. Feed Sci. Technol. 39: 357-368.

Aùfrere, J.; Cartailler, D., (1988). Ann. Zootech. 37: 255-270.

de la Roza, B.; Martínez, A.; Modroño, S.; Gómez, G.; González, J.; Repetto, J.L., (1998). Actas de la XXXVIII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. pp: 223-226.

de la Roza, B.; Martínez, A.; Modroño, S.; Rodríguez, C.; Argamentería, A. (2001). ITEA Volumen Extra, 22: 340-342.

Ørskov, E.R.; McDonald, I. (1979). J. Agr. Sci., Camb. 92: 499-503.

SAS (1990). SAS/STAT User Guide. Ver. 6.4th SAS Inst. INC. North Carolina. USA.

Stern, M.D.; Bach, A.; Calsamiglia, S. (1997). J. Anim. Sci. 75: 2256-2276.

Tománková, O.; Kopečný, J., (1995). Anim. Feed Sci. Technol. 53: 71-80.