

EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE N NO PROTEICO POR PROTEÍNA DE SOJA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*

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

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

INTRODUCCIÓN

El tipo de alimento ingerido por los animales rumiantes es uno de los principales factores que afectan a la cantidad de metano (CH_4) que producen, estando claramente demostrado que la fermentación de los alimentos ricos en carbohidratos estructurales da lugar a una mayor cantidad de este gas, por unidad de alimento ingerido, que los alimentos ricos en carbohidratos no estructurales (Johnson y Johnson, 1995). En lo que se refiere a la proteína, se ha constatado que las características de la proteína de la dieta afectan a la cantidad de gas producida en la fermentación ruminal *in vitro* (Carro *et al.*, 1999; Ranilla *et al.*, 2001; Cone *et al.*, 2009), pero no existen estudios que hayan analizado el efecto del tipo de aporte de nitrógeno (N) que reciben los rumiantes sobre la producción de CH_4 . Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar la influencia del tipo de fuente nitrogenada (N no proteico vs. N proteico) sobre la producción de CH_4 durante la fermentación *in vitro* de dos sustratos con diferente ritmo de degradación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del experimento se utilizaron dos sustratos puros formados por mezclas de almidón y celulosa. El primer sustrato (Almidón) estaba formado por almidón y celulosa en relación de 75:25 (en base a materia seca (MS)) y el segundo sustrato (Celulosa) por una mezcla de almidón y celulosa en relación 25:75. Los sustratos se incubaron con tres fuentes de nitrógeno diferentes administradas en cantidades isonitrogenadas: cloruro de amonio (NH_4Cl ; NNP), proteína purificada de soja (S100) y una mezcla al 50% de NH_4Cl y proteína de soja (S50).

Las incubaciones se llevaron a cabo en viales de vidrio (115 ml) en los que se pesaron 160 mg de materia seca de sustrato y se añadieron las cantidades correspondientes de las fuentes nitrogenadas. Para el tratamiento NNP se preparó una solución que contenía 2,1048 g de NH_4Cl en 100 ml de agua destilada y se dosificó 1 ml de esta solución. En los viales del tratamiento S50 se pesaron 20 mg de proteína de soja (PS) y se añadió 1 ml de la solución anterior diluida al 50% con agua destilada. Finalmente, en los viales del tratamiento S100 se pesaron 40 mg de PS y se añadió 1 ml de agua destilada. Todos los tratamientos aportaron 34 mg de N por g de materia orgánica de sustrato para no limitar el crecimiento microbiano.

El líquido ruminal se obtuvo 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. 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 del $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ por NaHCO_3 y la no inclusión de tripticasa para que el medio no aportase N. Además, al medio de cultivo se le añadió una solución de ácidos isobutírico, isovalérico y valérico (27, 72, y 92 mg por litro de medio de incubación, respectivamente) para cubrir las necesidades de las bacterias celulolíticas (Hume, 1970). El fluido ruminal se mezcló con el medio de cultivo en una relación 1:4 (vol/vol) a 39 °C bajo gaseado continuo con CO_2 , dosificándose 20 ml de la mezcla en cada vial mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31). Los viales 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) 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 CH_4 . Tras medir el pH del contenido de los viales se tomaron muestras para el análisis de su concentración en nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) y ácidos grasos volátiles (AGV) siguiendo los procedimientos descritos por Martínez *et al.* (2010).

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza, utilizando un modelo mixto en el que la fuente de nitrógeno, el sustrato y la interacción fuente de N x sustrato se consideraron efectos fijos y el inóculo (oveja donante) se consideró un efecto aleatorio. La respuesta lineal y cuadrática a la sustitución de niveles crecientes de NNP por N proteico se analizó mediante polinomios ortogonales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, la sustitución de NNP por cantidades crecientes de PS produjo un aumento cuadrático de la producción de CH₄ y AGV (P<0,001), lo que indicaría una estimulación de la fermentación ruminal y la generación de CH₄ debida a la disponibilidad de proteína. Comparados con el tratamiento NNP, los tratamientos S50 y S100 provocaron un aumento de la producción de CH₄ del 51,0 y 50,6% para el sustrato Almidón y del 7,7 y 29,7% para el sustrato Celulosa, respectivamente, justificando estas diferencias la interacción tipo de fuente de N x sustrato observada (P=0,002). Carro y Miller (1999) observaron un aumento similar al del sustrato Celulosa (10,1%) al sustituir la mitad del NNP aportado por PS en fermentadores Rusitec que recibían un sustrato fibroso.

Tabla 1. Efecto de la sustitución de N no proteico (NNP) por proteína purificada de soja sobre la fermentación ruminal in vitro de sustratos formados por almidón y celulosa en proporción 75:25 (almidón) o 25:75 (celulosa).

Item	Sustrato (S)						eem ⁵	P-valor ¹		
	Almidón			Celulosa				Sustitución NNP		S
	NNP ²	S50 ³	S100 ⁴	NNP ²	S50 ³	S100 ⁴		L ⁶	C ⁷	
Gas (µmol)	2076	1903	2063	931	937	1138	59,1	0,18	0,02	0,001
CH ₄ (µmol)	259	391	390	195	210	253	13,4	0,001	0,001	0,001
Ácidos grasos volátiles										
Total (µmol)	863	923	959	313	411	497	23,8	0,005	0,001	0,001
Acético (µmol)	472	576	590	179	244	307	14,2	0,001	0,001	0,001
Propiónico (µmol)	199	145	156	66,0	65,7	73,5	13,08	0,09	0,83	0,001
Butírico (µmol)	167	169	175	55,0	82,0	86,7	6,50	0,09	0,07	0,001
Otros ⁸ (µmol)	25,0	33,0	38,0	13,0	19,3	29,8	5,39	0,80	0,07	0,007
Acét./Prop.	2,40	4,23	4,01	2,99	3,85	4,19	0,527	0,07	0,23	0,44
CH ₄ /AGV	0,300	0,424	0,407	0,623	0,511	0,509	0,0424	0,93	0,86	0,001
NH ₃ -N (mg/l)	295	232	175	285	223	187	13,8	0,001	0,001	0,85

¹La interacción entre la sustitución de NNP y sustrato (S) fue no significativa para los parámetros evaluados, excepto para CH₄: P= 0,002 y CH₄/AGV: P=0,009; ²100% NH₄Cl; ³50% NH₄Cl:50% proteína purificada soja; ⁴100% proteína purificada de soja; ⁵error estándar de la media; ⁶Efecto lineal de la sustitución de NNP por N proteico; ⁷Efecto cuadrático de la sustitución de NNP por N proteico; ⁸ Suma de los ácidos isobutírico, isovalérico, valérico y caproico.

La sustitución del 50 y 100% del NNP por PS produjo un aumento de la producción de AGV del 4,4 y 6,3% para el sustrato almidón y 33,1 y 58,9% para el sustrato celulosa (P<0,001), respectivamente, que fueron debidos principalmente a un aumento en la producción de acético. El aumento menos marcado de la producción de AGV al aportar proteína al sustrato Almidón, que es rápidamente degradable, comparado con el observado con el sustrato Celulosa, con un ritmo lento de degradación, podría deberse a que en el primer caso existió energía rápidamente disponible para los microorganismos y los aminoácidos pudieron ser utilizados para sintetizar proteína microbiana. Por el contrario, con el sustrato celulosa se

limitó la disponibilidad de energía para los microorganismos, lo que provocó una mayor desaminación de los aminoácidos y la fermentación de sus esqueletos carbonados para producir AGV. Otros autores han obtenido aumentos similares en la producción de AGV al adicionar N proteico a sustratos fibrosos. Por ejemplo, Carro y Miller (1999) observaron un aumento del 32,3% de la producción de AGV al sustituir la mitad del NNP por PS en fermentadores Rusitec que recibían pared celular de heno como sustrato y Ranilla *et al.* (2001) obtuvieron un aumento de la producción de AGV del 22,1% al sustituir 2/3 del NNP por péptidos en fermentaciones *in vitro* (24 horas) con paja como sustrato.

Debido a la interacción sustrato x tipo de fuente de N observada para la relación CH₄/AGV (P=0,009), este parámetro se analizó independientemente para cada sustrato. La sustitución de NNP por niveles crecientes de PS produjo un aumento cuadrático (P= 0,033) de la relación CH₄/AGV con el sustrato Almidón, mientras que se observó un descenso cuadrático (P= 0,047) con el sustrato Celulosa. Estos resultados están en línea con una mayor fermentación de los aminoácidos para producir AGV con el sustrato Celulosa y una mayor incorporación de los mismos a la proteína microbiana con el sustrato Almidón.

La sustitución de cantidades crecientes de NNP por PS provocó una reducción cuadrática de la concentración de NH₃-N (P=0,001), que pudo ser debida a una mayor captación de NH₃-N por los microorganismos ruminales para la síntesis de proteína microbiana y/o a una degradación incompleta de la PS tras 16,5 horas de fermentación. Como era de esperar, la producción de gas, metano y AGV fueron mayores (P<0,01) con el sustrato Almidón que con el sustrato Celulosa, aunque no se observaron diferencias (P>0,05) entre sustratos en la relación acético/propiónico ni en la concentración de NH₃-N.

En resumen, los efectos de la sustitución de NNP por N proteico sobre la producción de CH₄ y AGV dependieron del tipo de sustrato incubado, siendo mayores los aumentos observados con el sustrato rico en Almidón que el sustrato rico en Celulosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Carro, M.D., & Miller, E.L. 1999. Br. J. Nutr. 82: 149-157.
- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., & Ranilla, M.J. 1999. Archiv. Zootec. 48: 295-306.
- Cone, J.W. & Van Gelder, A.H. 1999. Anim. Feed Sci. Technol. 76: 251–264.
- Goering, M.K., & Van Soest, P.J. 1970. Agricultural Handbook, N°. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington DC.
- Hume, I.D. 1970. Austr. J. Agric. Res. 21: 297-304.
- Johnson, K.A., & Johnson, D.E. 1995. J. Anim. Sci., 73: 2483-2492.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. Ramos, S., & Carro, M.D. 2010. Anim. Feed Sci. Technol. 158: 126–135.
- Ranilla, M.J., Carro, M.D., López, S., Newbold, J.C., & Wallace, J. 2001. Br. J. Nutr. 86: 717-724.

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

INFLUENCE OF NITROGEN SOURCE ON *IN VITRO* METHANE PRODUCTION

ABSTRACT: Incubations were carried out with batch cultures to study the effects of different nitrogen (N) sources on *in vitro* fermentation by ruminal micro-organisms of two substrates of variable fermentation rate. The substrates were composed by starch and cellulose in proportions of 75:25 (starch) or 25:75 (cellulose). Three treatments were made by replacing ammonia-N (NH₄Cl) with purified soyabean protein (SP) at levels of 0 (NNP), 50% (S50) and 100% (S100) of total N. Compared with NNP, S50 and S100 treatments increased CH₄ production by 51.0 and 50.6% for starch and by 7.7 and 29.7% for cellulose substrates, respectively. The increases in volatile fatty acids (VFA) production were 4.4 and 6.3% for starch and 33.1 and 58.9% for cellulose substrates, respectively. These results indicate that the influence of N source on CH₄ and VFA production are influenced by the characteristics of the incubated substrate.

Keywords: Non-protein nitrogen, protein-N, methane, *in vitro* fermentation