

ARTÍCULO CIENTÍFICO

**EFFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS
SOBRE EL FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA EN MEZCLAS PARA
ENSILAJE**Michael López-Herrera¹, Ernesto Briceño-Arguedas²**RESUMEN**

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la fuente de carbohidratos sobre el fraccionamiento de la proteína en mezclas de ensilados elaborados a partir de las leguminosas, *Arachis pintoi*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*. Las fuentes de carbohidratos evaluadas fueron melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, grano de maíz molido y fruto inmaduro de guineo cuadrado. El experimento se desarrolló entre los años 2015 y 2016, y consta de un arreglo factorial 4x4 de 16 tratamientos, con 4 repeticiones por tratamiento. La parte experimental se desarrolló en Montes de Oca, Costa Rica y los forrajes fueron cosechados en Upala, Costa Rica. Las mezclas se almacenaron durante 50 días en silos de bolsa con capacidad para 5 kg. La interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidrato fue significativa ($p < 0,05$) para la fracción A, mientras que para las fracciones B2, B3 y C de la proteína, el efecto principal de la especie de leguminosa fue el que generó diferencias ($p < 0,05$). No se encontró diferencias entre las leguminosas arbustivas y las herbáceas, ni entre las fuentes de carbohidratos. La fracción B1 no fue afectada por ningún componente de la mezcla ($p > 0,05$). Mientras la fracción C aumentó en promedio cuando se utilizó fruto de guineo cuadrado. Los ensilados evaluados presentaron concentraciones de PDR entre 30,6 – 60,4% PC y de PnDR entre 26,5 – 55,9% PC, donde la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos fue la principal fuente de diferencias ($p < 0,05$) entre tratamientos. De los valores obtenidos de PDR 30,5 – 44,7% PC, pertenecen a nitrógeno no proteico (NNP) o fracción A. Mientras que, de los datos determinados para PnDR 9,9 – 24,0% PC pertenece a la fracción C. Se concluye que los ensilados evaluados poseen un alto contenido de PDR, lo que permite estimular la producción de proteína microbiana en el rumen, además poseen una adecuada concentración de PnDR que puede ser absorbida en el intestino delgado, llenar los requerimientos de nutrientes de animales de alta producción y mejorar el contenido de proteína en leche.

Palabras clave: conservación de forrajes, ensilajes de leguminosas, aditivos, calidad de ensilajes

¹ Universidad de Costa Rica. Centro de Investigación en Nutrición Animal y Escuela de Zootecnia. San Pedro, San José, Costa Rica. Autor para correspondencia: michael.lopez@ucr.ac.cr

² Finca Agroecológica Siempre Verde. Upala, Alajuela, Costa Rica. ebriceno@fincavocare.com

Recibido: 26 de febrero 2018 Aceptado: 31 de mayo 2018

ABSTRACT

Effect of the legume species and the carbohydrate source on the protein fractionation of silage mixtures. The objective of this experiment was to determine the effect of the carbohydrate source on the fractionation of the protein in silage mixtures made from legumes, *Arachis pintoi*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* and *Erythrina poeppigiana*. The sources of carbohydrates evaluated were molasses from sugarcane, dehydrated citrus pulp, ground corn kernels and immature square banana fruit. The experiment was developed between 2015 and 2016, and consists of a 4x4 factorial arrangement of 16 treatments, with 4 repetitions per treatment. The experimental part was developed in Montes de Oca, Costa Rica and the forages were harvested in Upala, Costa Rica. The mixtures were stored for 50 days in bag silos with a capacity of 5 kg. The interaction between the legume species and the carbohydrate source was significant ($p < 0.05$) for fraction A, while for fractions B2, B3 and C of the protein, the main effect of the legume species was which generated differences ($p < 0.05$). No differences were found between shrub legumes and herbaceous legumes, nor between carbohydrate sources. Fraction B1 was not affected by any component of the mixture ($p > 0.05$). While C fraction increased when square bananas were used. The silages evaluated showed RDP concentrations between 30.6 - 60.4% CP and of RUP between 26.5 - 55.9% CP, where the interaction between the legume species and the carbohydrate source was the main source of differences ($p < 0.05$) between treatments. From RDP values, 30.5 - 44.7% of CP, belong to non-protein nitrogen (NPN) or fraction A. While from RUP 9.9 - 24.0% of CP belongs to C fraction. It is concluded that the silages evaluated have a high content of RDP, which allows to stimulate the production of microbial protein in the rumen, in addition they have an adequate concentration of RUP that can be absorbed in the small intestine, filling the nutrient requirements of high production animals and improve the protein content in milk.

Keywords: forage conservation, legumes silage, additives, quality silage

INTRODUCCIÓN

El Modelo Cornell Net Carbohydrate Protein System (CNCPS) (Sniffen et al. 1992), considera que la proteína cruda está dividida en 5 fracciones, definidas como: A, B1, B2, B3 y C; de acuerdo a su posibilidad de ser degradada en el ambiente del rumen o a la posibilidad de superar la degradación del rumen y ser aprovechada en el intestino, inclusive considera la fracción de la proteína que no puede ser aprovechada y es excretada por el animal (Licitra et al., 1996).

Realizar estas determinaciones es necesario cuando se quiere maximizar el uso de los nutrientes en la dieta y la producción de proteína microbiana en el rumen (Guo et al., 2008), además reducir las pérdidas de nitrógeno que generan impacto sobre el medio ambiente y pérdidas económicas, al no aprovechar de manera eficiente los nutrientes (Lanzas et al., 2007). Finalmente, el determinar las diferentes fracciones de la proteína cruda permite conocer la cantidad de nitrógeno que logra sobrepasar el rumen, fracción que puede satisfacer los requerimientos de animales de alto rendimiento productivo (leche o carne) (Givens y Rulquin, 2004).

En los sistemas de producción tropicales de los países en desarrollo es común el uso de forrajes arbustivos leguminosos y no leguminosos, para aumentar la cantidad de nutrientes en las dietas de rumiantes (Steinfeld et al., 2006; McDermott et al., 2010). El uso de estos forrajes se ha extendido, como una estrategia para reducir el uso de alimentos balanceados de alto costo (Tobía et al. 2004), ya sea, mediante el uso de bancos forrajeros (Pezo e Ibrahim 1998) o en plantaciones para cosechar y conservar mediante el ensilaje (Tobía et al. 2004; Castillo et al. 2009). Por su parte, Singh et al., (2012) indican que los forrajes verdes tienen la capacidad de proveer los nutrientes requeridos por los animales de producción.

El contenido de proteína cruda de las leguminosas puede oscilar entre 18,0 – 30,0 % MS, que sobrepasa el requerimiento de los animales (Dewhurst et al., 2009). Sin embargo, cuando se realiza ensilaje de leguminosas, se obtienen altas concentraciones de nitrógeno degradable en el rumen, que conlleva a una ineficiente utilización del forraje y un aumento en la excreción de nitrógeno por la orina (Cohen et al. 2006). Además, de acuerdo a Dewhurst et al., (2009) ensilajes de trébol rojo (*Trifolium pratense*) poseen concentraciones de 30 – 40% de la proteína cruda en forma de nitrógeno no protéico (NNP) y entre 28 – 40% de proteína no degradable en el rumen (PnDR).

De esta manera, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la especie de leguminosa forrajera y la fuente de carbohidratos, sobre el fraccionamiento de la proteína cruda en mezclas ensiladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca, donde se realizaron los análisis de laboratorio. Los forrajes utilizados en esta investigación fueron obtenidos en la finca Agroecológica Vocaré ubicada en el cantón de Upala a 120 - 180 msnm, con una precipitación promedio de 2400 mm anuales y una temperatura promedio de 25,5 °C (Villalobos et al., 2013).

Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas

Los forrajes y edades de cosecha utilizados fueron: *Vigna unguiculata* (40 días), *Arachis pintoi* (40 días), *Cratylia argentea* (75 días) y *Erythrina poeppigiana* (75 días). Las edades de corte de las leguminosas se fijaron de acuerdo al hábito de crecimiento del forraje (de piso o de corte), con el fin de evitar forrajes muy maduros con alto contenido de fibra y lignina.

Los niveles de inclusión y las fuentes de carbohidratos utilizadas fueron: melaza de caña de azúcar (6,3% p/p), pulpa de cítricos deshidratada (8,4% p/p), maíz molido (6,4% p/p) y fruto inmaduro de guineo cuadrado (6,7% p/p) procurando proveer el 5% del total de carbohidratos no fibrosos de la mezcla. El 5% restante para alcanzar el 10% de carbohidratos no fibrosos, fue provisto por las leguminosas. El fruto inmaduro de guineo cuadrado se encontraba en estado inmaduro y completamente engrosado al momento de la cosecha.

Diseño experimental y tratamientos

El experimento se formuló con un diseño factorial completamente aleatorizado (4x4), con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y fruto de guineo cuadrado) y 4 especies leguminosas

(*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*). Todos los tratamientos se uniformizaron para contener 10 % de carbohidratos no fibrosos para asegurar una adecuada fermentación (Vargas, 1979; Hiriart, 2008). A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (elaborado por fermentación anaeróbica en la finca a partir de suero de leche, leche y melaza – *Lactobacillus* $1,0 \times 10^9$) (1L/tonelada) con base en el peso en fresco.

La conservación de los tratamientos se realizó por medio de la técnica de microsilos. Cada tratamiento fue repetido 4 veces para un total de 64 microsilos. Además, cada bolsa se consideró como una unidad experimental.

Procedimiento experimental

El ensilaje de las mezclas forrajeras se realizó mediante la técnica de microsilos de bolsa, para este fin se utilizó bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5 kg y grosor de 0,0063 mm. Cada bolsa se llenó con 4 kg de mezcla para ensilar. El material una vez depositado y compactado a mano, se extrajo el aire a fondo mediante aspiradora. Posterior a la eliminación del oxígeno, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se colocaron en condiciones de laboratorio (25°C, 75% humedad relativa, aproximadamente).

VARIABLES A EVALUAR

Cuando los materiales tuvieron 50 días de fermentación, se realizó la apertura de los silos y se envió el contenido de la bolsa al laboratorio de bromatología de forrajes para determinar: el contenido de proteína cruda (PC) por medio de la metodología descrita en el manual de la AOAC (1998), mientras que el fraccionamiento de la proteína (A, B1, B2, B3 y C) se realizó por medio de la metodología descrita por Licitra et al. (1996). Se calculó la proteína degradable en el rumen (PDR) y la proteína no degradable en el rumen (PnDR) de la siguiente manera: $PDR=A+B1$ y la $PnDR=B2+B3+C$ (Sniffen et al., 1992).

Análisis de la información

El análisis de la información se realizó con un Modelo ANOVA de INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2016) considerando como efectos principales: la fuente de carbohidratos (C), la especie de leguminosa (L) y la interacción de las fuentes principales (L*C). Para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nitrógeno no proteico (Fracción A)

Esta fracción está constituida principalmente por: NH_3 , NO_3 , junto con aminoácidos y péptidos libres) estas moléculas son degradadas de manera inmediata cuando ingresan al rumen, por lo que no hay nada que pase al intestino delgado (Chalupa y Sniffen, 1996). Así, la concentración de esta fracción de la proteína cruda fue afectado de manera significativa ($p < 0,05$) por la interacción entre la especie de leguminosa y el tipo de carbohidrato adicionado (Cuadro 1).

En esta investigación, la fracción A se mantuvo entre 3,9 – 8,9% de la materia seca, esto representa entre 28,3 – 56,9% de la proteína cruda total en cada tratamiento (Cuadro 1 y Figura 1). Al compararlos con los encontrados por Guo et al., (2008) (43,4 – 68,4% PC), se puede observar que los tratamientos evaluados presentan mucha variación, la cual puede estar determinada por la especie de leguminosa, la capacidad amortiguadora del forraje, y la calidad del ensilaje.

De acuerdo a Grabber (2009), la fracción A puede variar hasta 59% en materiales ensilados debido a procesos de proteólisis que ocurren en el ensilaje. Debido a esto, los valores de la fracción A son mayores en materiales ensilados que en materiales frescos. Además, Slottnner y Bertilsson (2006) señalan que durante el ensilaje, ocurren proceso de proteólisis que dependen de varios factores como: la temperatura, pH, compuestos inhibidores y el contenido de materia seca del forraje. De esta manera, ensilajes de mala calidad, permiten una degradación de las proteínas en amonio, que provocan un aumento del nitrógeno amoniacal en el silo, lo que en consecuencia aumenta la cantidad de fracción A del ensilado.

Cuadro 1. Contenido de proteína cruda (PC) y fraccionamiento de la proteína cruda en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	PC ¹ (% MS)	Fracciones de la proteína				
			A** (%PC)	B1**(% PC)	B2**(% PC)	B3**(% PC)	C**(% PC)
Vigna	Melaza	15,49	8,9 ^a (56,9)	0,55(3,5)	2,4 ^a (16,2)	1,5 ^d (10,2)	2,0 ^b (13,2)
	PCD	14,80	6,8 ^{abc} (46,4)	0,34(2,3)	3,1 ^a (21,1)	2,3 ^{cd} (15,8)	2,1 ^b (14,5)
	Maíz	15,97	7,6 ^{ab} (47,3)	0,30(1,8)	3,9 ^b (24,9)	2,6 ^{cd} (16,0)	1,6 ^a (9,9)
	Guineo	13,93	3,9 ^c (28,3)	0,30(2,3)	4,6 ^b (33,1)	2,7 ^{cd} (19,1)	2,4 ^b (17,2)
Arachis	Melaza	19,36	5,8 ^{abc} (29,9)	0,45(2,2)	4,7 ^b (24,6)	5,9 ^{ab} (30,6)	2,5 ^b (12,8)
	PCD	17,42	6,2 ^{abc} (35,4)	0,23(1,4)	4,5 ^b (26,0)	4,1 ^{bc} (23,2)	2,5 ^b (14,1)
	Maíz	17,89	5,2 ^{bc} (28,9)	0,38(2,1)	4,7 ^b (26,0)	5,4 ^{ab} (29,9)	2,3 ^b (13,0)
	Guineo	17,80	4,9 ^{bc} (28,1)	0,81(4,5)	4,2 ^b (23,4)	4,6 ^{ab} (25,8)	3,3 ^c (18,2)
Cratylia	Melaza	15,78	6,9 ^{abc} (43,9)	0,13(0,8)	2,6 ^a (16,6)	3,7 ^{bc} (23,3)	2,4 ^b (15,5)
	PCD	16,53	6,1 ^{abc} (36,9)	0,38(2,3)	3,2 ^a (19,9)	3,6 ^{bc} (21,8)	3,2 ^c (19,6)
	Maíz	16,08	6,6 ^{abc} (41,2)	0,98(6,1)	2,8 ^a (17,4)	2,6 ^{cd} (15,8)	3,1 ^c (19,4)
	Guineo	16,48	7,8 ^{ab} (47,6)	0,48(2,8)	2,7 ^a (16,6)	2,2 ^{cd} (13,5)	3,2 ^c (19,6)
Erythrina	Melaza	16,67	5,8 ^{abc} (34,8)	0,28(1,6)	4,5 ^b (26,8)	2,5 ^{cd} (14,9)	3,7 ^c (21,9)
	PCD	16,06	5,9 ^{abc} (36,8)	0,27(1,7)	3,9 ^b (24,6)	2,3 ^{cd} (14,2)	3,7 ^c (22,7)
	Maíz	15,19	5,9 ^{abc} (39,3)	0,44(2,9)	4,3 ^b (28,1)	1,6 ^d (10,9)	2,9 ^c (18,8)
	Guineo	15,41	5,3 ^{bc} (34,3)	0,31(2,0)	3,8 ^b (24,1)	2,3 ^{cd} (14,7)	3,7 ^c (24,0)
Valor de p							
Leguminosa (L)			0,0095	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CHO (C)			-	-	-	-	0,0020
LxC			0,0123	-	-	-	-
E.E. ***			0,69 (3,97)	0,26 (1,63)	0,44 (2,64)	0,36 (1,80)	0,23 (1,34)

¹ Proteína cruda, * Fuente de carbohidratos, ** Como % de la materia seca, *** Error estándar

^{a,b} Letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0,05)

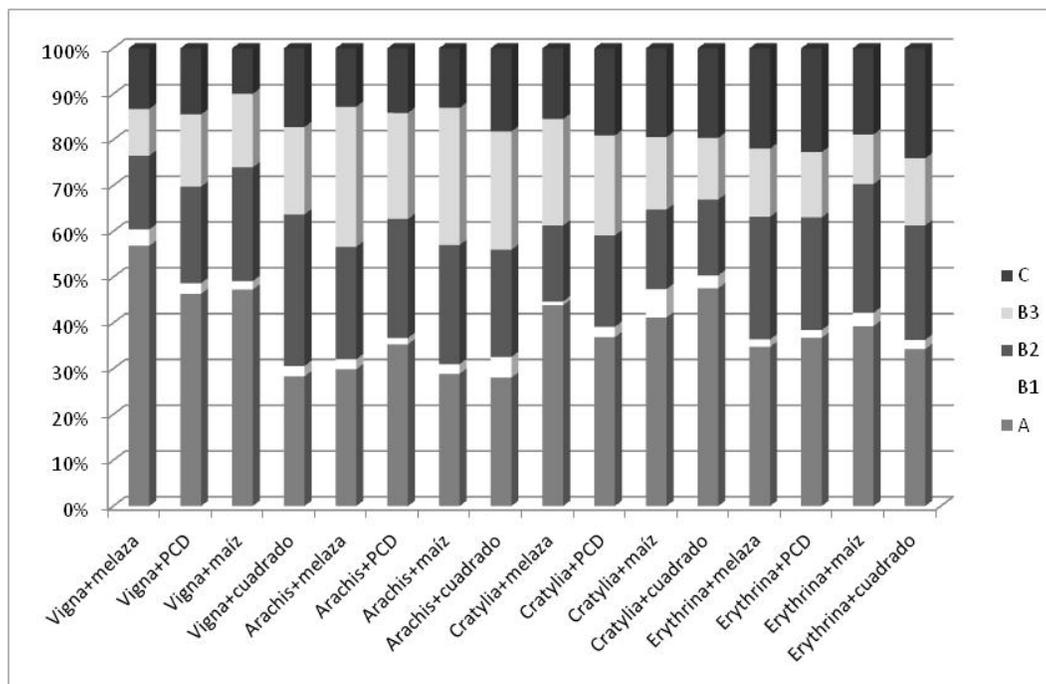


Figura 1. Distribución de las fracciones de la proteína de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación. Expresado como porcentaje de la proteína total. San José, Costa Rica. 2016.

Los valores de fracción A obtenidos en esta investigación para mezclas con *Arachis pintoï*, son similares a los obtenidos por WingChing y Rojas, (2007) con ensilados de *Arachis pintoï*. Además, todos los tratamientos evaluados tuvieron contenidos mayores de fracción A comparados a los datos publicados por Betancourt de Flores et al., (2002) en ensilajes de *Leucaena leucocephala*. Sin embargo, todas las mezclas ensiladas presentaron menor cantidad de fracción A, con respecto al trabajo de Miquilena et al. (1995) con plantas de *Gliricidia sepium*. Estas variaciones entre trabajos pueden ser explicadas por diferencias en las especies forrajeras utilizadas, capacidad amortiguadora de los forrajes, concentración de carbohidratos solubles antes del ensilaje y contenido de humedad de los forrajes, los cuales afectan la calidad del ensilaje y pueden afectar la concentración de esta fracción (Hiriart, 2008).

Fracciones de proteína verdadera (Fracciones B1, B2 y B3)

Fracción B1

En esta investigación los valores oscilaron entre 0,13 – 0,44% de la materia seca, lo que representa 0,13 – 6,11% de la proteína cruda (Cuadro 1 y Figura 1). De acuerdo al análisis estadístico, ni la especie de leguminosa, ni la fuente de carbohidratos generan diferencias significativas entre los tratamientos. De acuerdo a Chalupa y Sniffen, (1996) esta fracción está compuesta por globulinas y algunas albúminas, las cuales son degradables en el rumen (200 – 300%/h), pero hay parte de la proteína que pasa para ser absorbida en el intestino delgado (100%).

Los valores obtenidos en esta investigación son bajos al compararlos con otras investigaciones (Betancourt de Flores, 1996) donde esta fracción alcanza el 30% del total de proteína cruda. Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente, cuando ocurren procesos de ensilaje deficientes, puede ocurrir degradación de las proteínas en aminos y nitrógeno amoniacal (McDonald, 1981; Grabber, 2009). Además, la severidad de la degradación depende del pH y humedad final en el material ensilado, ya que de esto depende la eliminación de las bacterias degradadoras como las clostridiales (Hiriart, 2008). Esto coincide con lo encontrado por Guo et al., (2008), quienes detectaron al someter forrajes frescos de alfalfa (*Medicago sativa*) al proceso de ensilaje sin aditivos, se reduce de manera significativa la concentración de la fracción B1 contra un aumento de la fracción A.

En esta investigación no se puede asegurar que haya ocurrido un proceso de degradación de la proteína de los forrajes, ya que no se cuenta con información de los materiales previo al ensilaje. Por otra parte, Dewhurst et al., (2009) determinaron que ensilados de *Trifolium pratense* poseen concentraciones de NNP entre 30 – 40% de la proteína cruda; mientras que, Fulkenson et al., (2007) obtuvieron concentraciones de NNP promedio de 39,8% de la proteína cruda cuando analizaron forrajes de *Vigna unguiculata* durante el verano.

De acuerdo a Charmley, (2001), este aumento en la proteólisis de la fracción B1, puede conducir a la disminución en el consumo del alimento debido a la alta concentración de nitrógeno amoniacal. Para Givens y Rulquin, (2004), esta situación puede agravarse hasta el punto de intoxicar a los animales, especialmente en animales cuyas dietas son exclusivas de ensilajes. Por este motivo, es importante tomar las previsiones para reducir la producción de nitrógeno amoniacal en el silo, tal

como aumentar el contenido de materia seca (Fransen y Strubi, 1998), aumentar la cantidad de carbohidratos solubles y el uso de bacterias productoras de ácido láctico exógenas (Yitbarek y Tamir, 2014).

Los valores obtenidos en esta investigación fueron menores a los obtenidos por Grabber, (2009) (1,49 – 2,08% MS) con diferentes leguminosas forrajeras de clima templado. Aunque mayores a los reportados por Guo et al., (2008) (0,31% MS) con ensilados de alfalfa sin aditivos. Estas diferencias se explican por la especie de leguminosa utilizada, ya que en las pesquisas antes mencionadas se utilizaron especies leguminosas de clima templado; mientras que en esta investigación se utilizaron especies de clima tropical. Las diferencias obtenidas también pueden ser debidas al uso de fuentes de carbohidratos y a la concentración de carbohidratos solubles en los forrajes utilizados, que de alguna manera redujeron el pH en el silo y favorecieron un mejor ensilaje que el obtenido en las investigaciones de Guo et al., (2008) y Grabber (2009).

Fracción B2.

Los valores obtenidos de esta fracción oscilaron entre 2,4 – 4,7% de la materia seca, lo que representa 16,2 – 33,1% de la proteína cruda (Cuadro 1 y Figura 1). Además, de acuerdo al análisis estadístico, sólo la especie de leguminosa generó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,0001$). De esta manera, la especie *Cratylia argentea* fue la que presentó menor concentración de esta fracción (2,8% MS); mientras que, el *Arachis pintoi* que presentó el promedio más alto de fracción B2 (4,5% MS). Esta fracción es de gran relevancia para llenar los requerimientos de animales de alto desempeño productivo, ya que los microorganismos del rumen no pueden proveer toda la proteína necesaria para una adecuada cantidad y calidad de leche o carne, por el contrario, se requiere de proteína de sobre paso que provea suficientes aminoácidos para mantener una buena productividad (Sampath et al., 2005; Walli, 2005)

Los valores obtenidos en esta investigación son menores a los reportados por Grabber, (2009) (10,68 – 11,22% MS) y Seguin et al., (2002) (12,10 – 13,34% MS) con leguminosas forrajeras de clima templado sin ensilar, es posible que esto se deba a un efecto de especie, al comprar con este estudio donde todas las especies son tropicales. Aunque similares a los obtenidos por Guo et al., (2008) quienes trabajaron con ensilados de alfalfa. Cuando se compara entre los trabajos citados, se puede observar que en materiales frescos esta fracción es más alta, mientras que en

materiales ensilados es menor, lo que podría suponer que hay menor descomposición de las proteínas de la fracción B2 en amonio, durante el proceso de ensilaje.

Fracción B3.

El contenido de esta fracción en los ensilados fue afectado de manera significativa por la interacción de la especie de leguminosa y la fuentes de carbohidratos ($p < 0,001$). La concentración de fracción B3 de los tratamientos evaluados en esta investigación, oscilaron entre 1,6 – 5,9% de la materia seca, lo que representa 10,2 – 30,6% de la proteína cruda total (Cuadro 1 y Figura 1).

Sin embargo, en este caso, tanto *Erythina poepiggiana* y *Vigna unguiculata*, fueron las que presentaron menor concentración de esta fracción (2,2 y 2,3% MS, respectivamente), mientras que el *Arachis pintoii*, mostró el promedio más alto de esta fracción (5,0% MS). Estas diferencias pueden ser debidas al contenido de esta fracción en cada una de las especies utilizadas o si ocurrió daño en las proteínas durante el ensilaje, lo que coincide con lo encontrado por Adesogan, (2006) quien señala que, si no se aseguran ambientes para ensilajes de calidad, las proteínas se pueden desnaturalizar y bajar su calidad alimenticia.

En cuanto a la fuente de carbohidratos, en promedio, los tratamientos elaborados con pulpa de cítricos deshidratada y fruto de guineo cuadrado fueron los que presentaron mayor concentración de esta fracción. Esto coincide con lo encontrado por López-Herrera et al., (2016), quienes incrementaron el contenido de esta fracción, al incluir pulpa de cítricos deshidratada en la mezcla. En el caso del fruto de guineo cuadrado inmaduro, sus almidones no participan del proceso de ensilaje, por inactivación de la amilasa al reducir el pH en el silo (López-Herrera y Briceño-Arguedas, 2017) situación que pudo afectar el ambiente en el silo y promover la desnaturalización de las proteínas de los forrajes. También concuerda con los hallazgos de López-Herrera et al., (2017), quienes encontraron que al incrementar el contenido de fruto de guineo cuadrado se genera un incremento en la concentración de la fracción B3, lo que supone que gran parte de la proteína del fruto pertenece a esta fracción; aunque se debe realizar más investigación al respecto.

Los tratamientos evaluados poseen contenidos de fracción B3 menores a los reportados por Lanzas et al., (2009) (4,6% MS) para ensilados de alfalfa, salvo los tratamientos donde se utilizó *Arachis*, ya que estos fueron similares. Además, fueron menores a los datos presentados en el trabajo de Brown y Pitman, (1991) (8,0 – 10,4 % MS) en forrajes de *Indigofera hirsuta* y de *Aeschynomene americana*. Finalmente,

los valores obtenidos en los tratamientos elaborados con *Cratylia* y *Arachis* son similares a los reportados por Alzueta et al., (2001) en forraje de *Vicia sativa* L. en llenado de fruto, pero menores en los tratamientos elaborados con *Erythrina* y *Vigna*. Todo lo anterior, reafirma lo determinado en este trabajo acerca de el efecto de la especie de leguminosa en el contenido de esta fracción, tanto en los forrajes como en el silo, esto concuerda con lo encontrado por Guo et al., (2008) y Grabber, (2009).

Proteína indigestible (Fracción C)

En esta investigación se obtuvieron valores entre 1,6 – 3,7% de la materia seca, lo que representa 9,97 – 24,03% de la proteína cruda total (Cuadro 1 y Figura 1). La concentración de la fracción C en los tratamientos evaluados fue afectada por los efectos individuales de la especie de leguminosa y por el tipo de carbohidrato adicionado.

De esta manera, la *Vigna unguiculata*, fue la que presentó menor concentración de esta fracción (5,01% MS), mientras que la *Cratylia argentea* y la *Erythrina poeppigiana*, mostraron el promedio más alto de esta fracción (2,03 y 2,28% MS, respectivamente). Esto puede ser debido a que tanto la *Cratylia* como la *Erythrina* son forrajes leñosos y de mayor edad, con mayor contenido de lignina, y en consecuencia, mayor contenido de nitrógeno ligado a la lignina. Esto coincide con lo reportado por Mafongoya et al., (1998) y Alzueta et al., (2001) quienes detectaron que conforme aumenta la madurez de la planta, también aumenta la concentración de la fracción C en el forraje.

En lo que respecta a la fuente de carbohidratos, los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada y fruto de guineo cuadrado, presentaron mayor contenido de proteína indigestible (2,9 y 3,1% MS, respectivamente). Ambos aditivos aumentan de maneras distintas el contenido de la fracción C en los ensilados. La pulpa de cítricos deshidratada aumenta la cantidad de proteína indigestible, debido a que, durante la elaboración de la PCD, la exposición al calor aumenta la cantidad de transformaciones por reacciones de tipo Maillard (Garau et al., 2007), por lo que al utilizar este material, se incrementa esta fracción en las mezclas forrajeras. Esto coincide con lo encontrado por López-Herrera et al., (2016) quienes encontraron que al utilizar la pulpa de cítricos como aditivo en ensilados de corona de piña se incrementa la fracción C en los ensilados. También coincide con la investigación de López-Herrera et al., (2017), quienes determinaron que al incrementar el contenido de fruto de guineo cuadrado en mezclas para ensilaje se genera un incremento en la concentración de la fracción C, lo

que supone un que gran parte de la proteína del fruto está ligada a la fibra en detergente neutro; no obstante se debe realizar más investigación en las fracciones de la proteína en el fruto.

Por su parte, el guineo cuadrado permite el aumento de las reacciones de Maillard en el silo, debido a que no permite el adecuado aporte de carbohidratos solubles en el silo, situación que pudo propiciar aumento de temperatura en el silo (Goering et al., 1973; Adesogan, 2006). También Chalupa y Sniffen, (1996) Betancourt de Flores et al., (2002), encontraron que durante proceso de ensilaje puede ocurrir aumento en la concentración de proteína insoluble, por transformación de los nutrimentos debidas a reacciones tipo Maillard.

Las mezclas ensiladas evaluadas presentaron contenidos de fracción C similares a los reportados por Gierus et al., (2012) (2,37% MS) para ensilados de alfalfa y a los valores publicados en el trabajo de Guo et al., (2008) (2,60% MS). Aunque mayores a las concentraciones obtenidas por Seguin et al., (2002) con forraje fresco de diferentes especies de leguminosas de clima templado. También fueron mayores a los encontrados por Betancourt de Flores et al., (2002) (1,95% MS) en ensilados de *Leucaena leucocephala*. Estas diferencias pueden ser debidas a la concentración de esta fracción en cada una de las especies forrajeras utilizadas y si los forrajes estuvieron expuestos a calor durante el ensilaje.

Relación entre fracciones de la proteína cruda

Proteína degradable en el rumen.

Los ensilados evaluados contienen entre 30,6 – 60,4% PC de proteína degradable en el rumen (Cuadro 2). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, estas provienen de la interacción entre la especie de leguminosa forrajera y el tipo de carbohidrato adicionado (Cuadro 2). Esta fracción hace referencia a la proteína que se degrada en el rumen y es convertida en proteína microbial o excretada como urea en la orina (Reynal y Broderick, 2005). Por esta razón, lo ensilados deben complementarse con alimentos más energéticos que permitan aprovechar mejor los nutrimentos de los ensilados (Dewhurst et al., 2009)

Cuadro 2. Contenido de proteína degradable en el rumen (PDR), proteína no degradable en el rumen (PnDR) y proteína indigestible (PI), en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	PDR	PnDR	PI**
		(% PC)	(% PC)	(% PC)
Vigna	Melaza	60,4 ^a	39,6 ^c	13,2 ^b
	PCD	48,7 ^b	51,3 ^b	14,5 ^b
	Maíz	49,1 ^b	50,9 ^b	9,9 ^b
	Guineo	30,6 ^c	69,4 ^a	17,2 ^a
Arachis	Melaza	32,1 ^c	67,9 ^a	12,8 ^b
	PCD	36,7 ^c	63,3 ^a	14,1 ^b
	Maíz	31,0 ^c	68,9 ^a	13,0 ^b
	Guineo	32,6 ^c	67,5 ^a	18,2 ^a
Cratylia	Melaza	44,7 ^b	55,3 ^b	15,5 ^b
	PCD	39,1 ^c	60,9 ^a	19,6 ^a
	Maíz	47,3 ^b	52,6 ^b	19,4 ^a
	Guineo	50,4 ^b	49,6 ^b	19,6 ^a
Erythrina	Melaza	36,4 ^c	63,6 ^a	21,1 ^a
	PCD	38,5 ^c	61,6 ^a	22,7 ^a
	Maíz	42,2 ^b	57,8 ^b	18,8 ^a
	Guineo	36,3 ^c	63,7 ^a	24,0 ^a
Valor de p				
Leguminosa (L)		<0,0001	<0,0001	<0,0001
CHO (C)		-	-	0,0001
LxC		0,0015	0,0015	-
E.E.***		3,77	3,77	1,34

* Fuente de carbohidratos, ** PI = % fracción C, *** Error estándar

^{a,b} Letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0,05)

En lo que respecta a la especie de leguminosa, los ensilados tanto de Vigna (47,2% PC) como de Cratylia (45,4% PC) fueron las que presentaron en promedio mayor concentración de proteína degradable en el rumen (p<0,05), mientras que Erythrina (38,4% PC) y Arachis (33,1% PC), fueron las que mostraron en promedio, una concentración menor de PDR (p<0,05). Estas diferencias no siguen ningún patrón en cuanto al hábito de crecimiento, ya que no influye si la leguminosa es herbácea o arbustiva, lo que sugiere un efecto propio de cada especie. Con respecto a la fuente de carbohidratos durante el ensilaje, tal y como se señala en el trabajo de Grabber,

(2009) el valor de fracción A de los ensilados, puede tener 59% de variación debido al grado de proteólisis que haya ocurrido durante el ensilaje.

Slottner y Bertilsson, (2006) respaldan lo comentado en el párrafo anterior, ya que explican que durante el proceso de ensilaje ocurren proceso de proteólisis, que dependen de varios factores como: la temperatura, pH, compuestos inhibidores y el contenido de materia seca del forraje. De esta manera, ensilajes donde no se conocen las características de los forrajes a ensilar y no se agrega aditivos cuando se requiere para asegurar ensilados de calidad, permiten una degradación de las proteínas a amonio, lo que aumenta el nitrógeno amoniacal en el silo y en consecuencia la cantidad de fracción A del ensilado.

Los ensilados que se elaboraron con *Arachis* y *Erythrina* presentaron contenidos de proteína degradable en el rumen similares a los reportados por WingChing y Rojas, (2007) (35,8% PC) para ensilados de *Arachis pintoi* con 50 días de fermentación; sin embargo, los ensilados elaborados con *Vigna* y *Cratylia* presentaron valores mayores (31,8% y 26,8%, respectivamente). Todos los tratamientos presentaron valores menores a los reportados en el trabajo de Guo et al., (2008) en ensilados de alfalfa sin aditivos (69,9% PC). Esto debido a diferencias propias de cada especie de leguminosa y al grado de participación de cada fuente de carbohidratos durante el ensilaje.

Proteína no degradable en el rumen.

Los materiales ensilados presentaron valores entre 26,5 – 55,9% PC de proteína de sobrepaso (Cuadro 2). Al igual que con la proteína degradable, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, que provienen de la interacción entre la especie de leguminosa forrajera y a la fuente de carbohidratos (Cuadro 2).

De esta manera, los ensilados de *Erythrina* y *Arachis*, fueron las que presentaron en promedio (sin ser diferentes entre si), mayor concentración de proteína sobrepasante (61,7 y 66,9% PC, respectivamente), mientras que los ensilados elaborados con *Vigna* y *Cratylia* (sin ser diferentes entre si) fueron las que mostraron en promedio, una menor concentración de proteína sobrepasante (52,8 y 54,6% PC, respectivamente). Esto sugiere un efecto de especie, ya que no hay una tendencia en cuanto al hábito de crecimiento y madurez de la planta, lo que coincide con lo reportado en el trabajo de Guo et al., (2008).

Todos los tratamientos presentaron concentración de proteína no degradable en el rumen mayor, que las encontradas por Foster et al., (2011) (4,33 – 13,80% PC), quienes trabajaron con henolajes de leguminosas de clima tropical. Esto puede ser debido a diferencias en la forma de procesamiento del forraje. Además, mientras que los tratamientos elaborados con *Erythrina* y *Arachis* fueron similares que los datos obtenidos por WingChing y Rojas, (2007) (62,46 – 67,9% PC) para ensilados de *Arachis pintoi* con 50 – 60 días de fermentación; los ensilados elaborados con *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea*, presentaron valores menores, debido a la interacción de los forrajes con las fuentes de carbohidratos utilizadas. Estos pudieron afectar la composición final de los ensilados, ya que el *Arachis* utilizado en esta investigación es más tierno que el utilizado en el experimento de WingChing y Rojas, (2007).

Finalmente, todos los ensilados de esta investigación mostraron valores mayores de proteína indigestible al compararlos con los resultados publicados por Lanzas et al., (2007) (7,4% PC) con ensilados de alfalfa. Esto puede ser debido a diferencias entre las especies de leguminosas, diferencias por ser plantas de clima tropical contra la alfalfa que es de clima templado y diferencias producidas por las fuentes de carbohidratos utilizadas que pueden aumentar la cantidad de proteína indigestible o propiciar que aumente esta fracción en el ensilado.

CONSIDERACIONES FINALES

Los ensilados analizados presentaron un contenido elevado de fracción A en comparación con las otras fracciones de la proteína cruda, sobretudo la fracción B1. Se puede asumir que hubo degradación de las proteínas de la fracción B1 a amonio, lo que redujo la cantidad de esta fracción en los ensilados; sin embargo, no se puede dar certeza de la magnitud de la degradación debido a que no se conoce el contenido de fracción B1 en los forrajes antes del ensilaje.

Los ensilados donde se utilizó guineo cuadrado, presentaron un incremento en las fracciones B3 y C, debido a que puede promover el calentamiento de la masa ensilada, lo que aumentaría las reacciones Maillard en el silo y desnaturalización de algunos compuestos proteicos.

Los ensilados analizados poseen un contenido de proteína degradable elevado, que debe ser balanceado con fuentes energéticas que permitan reducir las pérdidas de

nutrimentos por orina. Sin embargo, poseen un adecuado contenido de proteína de sobrepaso que puede ser utilizado para mejorar la alimentación de animales de alta producción, ya que hay mayor flujo de proteína al intestino delgado, lo que aumenta la concentración de proteína en leche.

LITERATURA CITADA

Adesogan, A.T. 2006. Factors affecting corn silage quality in hot and humid climates. 17th Florida Ruminant Nutrition Symposium. Florida. 1-2 February IFAS Extension. University of Florida. 108 – 127.

Alzueta, C., Caballero, R., Rebole, A., Trevino, J., Gil, A. 2001. Crude protein fractions in common vetch (*Vicia sativa* L.) fresh forage during pod filling. *Journal of Animal Science* 79(9): 2449 – 2455.

Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD

Betancourt de Flores, M., Clavero, T., Razz, R. (2002). Compuestos nitrogenados en ensilajes de *Leucaena leucocephala*. *Revista Científica* 12(2): 566 – 568

Brown, W.F., Pitman, W.D. 1991. Concentration and degradation of nitrogen and fibre fractions in selected tropical grasses and legumes. *Tropical Grasslands* 25(1): 305 – 312.

Castillo, M., Rojas, A., WingChing, R. 2009. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*Vigna radiata*). *Agronomía Costarricense* 33(1):133 – 146.

Chalupa, W., Sniffen, C.J. 1996. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle—today and tomorrow. *Animal Feed Science and Technology* 58(1): 65 – 75.

Charmley, E. 2001. Towards improved silage quality-a review. *Canadian Journal of Animal Science* 81(2): 157 – 168.

Church D.C., Pond W.G., Pond K.R. 2003. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. LIMUSA WILEY. México D.F. 636 p

- Cohen, D.C., Stockdale, C.R. Doyle, P.T. 2006. Feeding an energy supplement with white clover silage improves rumen fermentation, metabolisable protein utilisation, and milk production in dairy cows. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 367–375
- Dewhurst, R.J., Delaby, L., Moloney, A., Boland, T., Lewis, E. 2009. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48: 167-187.
- Di Rienzo J A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo Y.C. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Foster, J.L., Carter J.N., Sollenberger L.E., Blount A.R., Myer R.O., Maddox M.K., Phatak S.C., Adesogan A.T. 2011. Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of ensiled warm-season legumes and bahiagrass. *Journal of Dairy Science* 94(4): 2042 – 2050.
- Fulkerson, W.J., Neal, J.S., Clark, C.F., Horadagoda, A., Nandra, K.S., Barchia, I. 2007. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: grasses and legumes. *Livestock Science* 107(2): 253 – 264.
- Garau, M.C., Simal, S., Rossello, C., Femenia, A. 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry* 104(3): 1014 – 1024.
- Gierus, M., Kleen, J., Loges, R., Taube, F. 2012. Forage legume species determine the nutritional quality of binary mixtures with perennial ryegrass in the first production year. *Animal Feed Science and Technology* 172(3): 150-161.
- Givens, D.I., Rulquin, H. 2004. Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 114(1): 1 – 18.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., Hemken, R.W. 1973. Relative susceptibility of forages to heat damage as affected by moisture, temperature, and pH. *Journal of Dairy Science* 56(1): 137 – 143.

- Grabber, J.H. 2009. Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology* 151(3): 324 – 329.
- Guo, X. S., Ding, W. R., Han, J. G., Zhou, H. 2008. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology* 142(1): 89 – 98.
- Hiriart M. 2008. *Ensilados. Procesamiento y Calidad*. Editorial Trillas. 2da edición. México. 110p.
- Lanzas, C., Tedeschi, L.O., Seo, S., Fox, D.G. 2007. Evaluation of protein fractionation systems used in formulating rations for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90(1): 507 – 521.
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57(4): 347 – 358.
- López-Herrera, M., WingChing-Jones, R., Rojas-Bourrillon, A. 2016. Bromatología de ensilados de corona de piña con pulpa de cítricos, heno y urea. *Agronomía Mesoamericana* 27(1): 37 – 47.
- Mafongoya, P.L., Nair, P.K.R., Dzwola, B.H. 1998. Mineralization of nitrogen from decomposing leaves of multipurpose trees as affected by their chemical composition. *Biology and Fertility of Soils* 27(2): 143 – 148.
- McDermott, J.J., Staal, S.J., Freeman, H.A., Herrero, M., Van de Steeg, J.A. 2010. Sustaining intensification of smallholder livestock systems in the tropics. *Livestock Science* 130(1): 95-109.
- McDonald P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons. Ltd. New York. 226 pp.
- Miquilena, E., Ferrer, O., & Clavero, T. (1995). Efecto de tres frecuencias de corte y dos densidades de siembra sobre las fracciones nitrogenadas en hojas y tallos de *Gliricidia sepium*. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 12(2): 193 – 207.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. National Academy Press. Washington DC. 408 p.

- Pezo, D, Ibrahim, M. 1998. Sistemas silvopastoriles. Colección de Modelos de Enseñanza Agroforestal No. 2. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Reynal, S.M., Broderick, G.A. 2005. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88(11): 4045 – 4064.
- Sampath, K.T., Chandrasekharaiyah, M., Praveen, U.S. 2005. Effect of bypass protein on milk production of crossbred cows-a field study. *Indian Journal of Animal Nutrition* 22(1): 41 – 43.
- Seguin, P., Mustafa, A.F., Sheaffer, C.C. 2002. Effects of soil moisture deficit on forage quality, digestibility, and protein fractionation of Kura clover. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188(4): 260 – 266.
- Singh, S., Kushwaha, B.P., Nag, S.K., Mishra, A.K., Singh, A., Anele, U.Y. 2012. In vitro ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology* 178(1): 2 – 11.
- Slottner, D., Bertilsson, J. 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127(1): 101 – 111.
- Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russel J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrates and protein availability. *Journal of Animal Science* 70: 3562 – 3577.
- Steinfeld, H., Wassenaar, T., Jutzi, S. 2006. Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. *Revue Scientifique et Technique* 25(2): 505-516.
- Tobía C., Rojas A., Villalobos E., Soto H., Uribe L. 2004. Sustitución parcial el alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2): 27 – 35.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37pp.

- Villalobos R., Jiménez E., Hernández K., Córdoba J., Solano P. 2013. Descripción del clima. Cantón de Upala. Instituto Meteorológico Nacional (IMN), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). Costa Rica. 18p.
- Walli, T.K. 2005. Bypass protein technology and the impact of feeding bypass protein to dairy animals in tropics: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences* 75(1): 135 – 142.
- WingChing-Jones, R., Rojas-Bourrillón, A. 2006. Dinámica fermentativa y fraccionamiento proteico durante el ensilaje de maní forrajero (CIAT 17434). *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 55 – 63.
- Yitbarek, M.B., Tamir, B. 2014. Silage Additives: Review. *Open Journal of Applied Sciences* (4): 258 – 274