

# Minimización de los efectos de las saponinas en concentrados proteicos de alfalfa para aves y porcino

A. LYLE LIVINGSTON y GEORGE O. KOHLER

Western Regional Research Center. Science and Education Administration.  
U. S. Department of Agriculture BERKELEY, California 94710 (1)

## RESUMEN

*Se prepararon concentrados proteicos de alfalfa (ALPC) a partir de cultivares de alfalfa de bajo y alto nivel de saponinas. A menos que la coagulación y lavado de la proteína se hiciera a pH alcalino, las saponinas tendían a concentrarse en la fracción proteica a niveles mayores que en la alfalfa original. Entre el 65 y 87 % de las saponinas totales quedaron en el residuo prensado después de la extracción del jugo.*

*Las fracciones proteicas de cultivares de bajo nivel en saponinas contenían menos del 0,07 % de éstas, mientras que las procedentes de los cultivares ricos en saponinas contenían hasta 1,33 %. Una revisión de los estudios de alimentación de porcino con ALPC muestra que se obtienen excelentes resultados en raciones de crecimiento-acabado. No se han detectado problemas en broilers alimentados con ALPC obtenido de alfalfas de bajo nivel en saponinas.*

## INTRODUCCIÓN

Inicialmente, las investigaciones sobre concentrados proteicos de hojas (leaf protein concentrates-LPC) han sido dirigidas fundamentalmente hacia la obtención de productos para consumo humano, especialmente en países en desarrollo (28). Aunque se dispone de mucha información útil, no se han desarrollado todavía aplicaciones prácticas. Parece que la razón de ello estriba en los costes y en la necesidad de maquinaria eficaz.

(1) Comunicación traducida y presentada, por delegación de los autores, por ADOLFO AMELLA, Colaborador Científico del Instituto de Economía y Producciones Ganaderas del Ebro (C.S.I.C.), Meguel Servet, 177 - Zaragoza.

Cuando nuestro Laboratorio se incorporó a este campo en 1968, tomamos como objetivo el desarrollo de sistemas adicionales para las plantas deshidratadoras, capaces de reducir el gasto energético y suministrar productos de alta concentración en proteínas y xantofilas, para alimentación de aves y, posiblemente, de otros animales. Así se desarrolló el proceso Pro-Xan, habiéndose ya instalado plantas comerciales en Francia y Colorado (USA).

El objeto de la fase II de este proceso es obtener dos fracciones de LPC: una para alimentación de aves y una segunda para consumo humano (proceso Pro-Xan II). Este proceso está actualmente en desarrollo a escala piloto en nuestro Laboratorio.

Los concentrados proteicos de alfalfa (APC - alfalfa protein concentrates) aparecen como excelente fuente de aminoácidos (2) y de otros nutrientes para porcino (5, 6, 8) y aves (17, 18), así como, potencialmente, para consumo humano (3). Sin embargo, la posible concentración de compuestos naturales biológicamente activos en estos productos, hace necesario desarrollar procedimientos para reducir al mínimo tales compuestos durante el procesado.

Los APC pueden ser ya preparados de forma que contengan niveles de estrógenos (cumestrol) más bajos que los de la alfalfa fresca o alfalfa prensada (14).

Además de los estrógenos de los forrajes, se ha encontrado que la alfalfa y otras leguminosas contienen saponinas biológicamente activas (4, 20, 27, 34), que pueden inhibir el crecimiento de pollos (HEYWANG, B. W. and H. R. BIRD, 1953) o disminuir la producción de huevos de gallina (1).

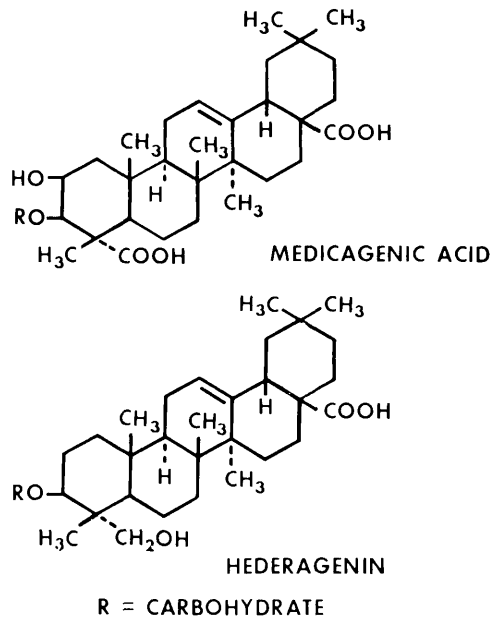


FIG. 1. Estructuras de las saponinas de alfalfa, biológicamente activas.



proceso (Pro-Xan), las proteínas solubles y las insolubles se precipitan juntas (LPC completo), dando lugar a un concentrado proteico pigmentado por la clorofila. En el segundo proceso (Pro-Xan II) se obtienen separadamente dos concentrados proteicos: uno con la clorofila (LPC verde) y otro blanco (LPC blanco) (9, 11).

#### METODOLOGÍA

Para nuestro estudio se utilizaron dos cultivares de alfalfa de la variedad Ranger, de alto y bajo contenido en saponinas, procedentes de la finca de la Universidad de California (Davis). La alfalfa fresca se molió a su pH natural (5,8-6,1) y se prensó en un sistema de doble tornillo, separando un jugo verde y un residuo. El jugo se ajustó después a pH 8,5 adicionando  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado. El LPC completo se preparó calentando porciones de 1.500 g de jugo verde a 80-85 °C, mediante inyección de vapor, manteniéndolo durante 5 minutos y enfriando después a temperatura ambiente. El coágulo proteico se colocó en un saqueto de tela de nylon, a manera de filtro, prensándose hasta contener el 35 o 40 % de sólidos, y luego se liofilizó (12). El jugo pardo resultante de este prensado se liofilizó igualmente para realizar el análisis de saponinas.

El LPC fraccionado se preparó calentando el jugo verde completo a 60 °C durante 20 segundos, mediante inyección de vapor y enfriando inmediatamente (9). Una cantidad del jugo calentado se centrifugó a 0 °C, a 27.000 g durante 20 minutos, para separar el LPC verde del LPC blanco. El líquido claro se decantó del precipitado verde y se calentó en baño de vapor hasta 85 °C durante 5 minutos, enfriándolo rápidamente después en baño de hielo. El coágulo blanco de LPC se colectó por centrifugación refrigerada, se lavó tres veces con agua y se liofilizó.

En algunos de los ensayos se varió el pH de coagulación y de los lavados para determinar los efectos sobre la distribución de las saponinas.

Los solubles de alfalfa resultantes de la preparación del LPC blanco también se liofilizaron.

TABLA 1

CONTENIDO EN SAPONINAS (% SOBRE MATERIA SECA) DE LOS PRODUCTOS DEL FRACCIONAMIENTO DE ALFALFAS DE BAJO Y ALTO NIVEL DE SAPONINAS

Producto	Alfalfa de bajas saponinas	Alfalfa de altas saponinas
Alfalfa completa .....	0,14	1,71
Alfalfa prensada .....	0,13	0,66
LPC completo (Pro-Xan) <sup>a</sup> .....	0,10	1,90
Solubles de alfalfa <sup>a</sup> .....	0,06	0,65
LPC verde (Pro-Xan II) <sup>a</sup> .....	0,08	1,54
LPC blanco <sup>a</sup> .....	0,21	2,88
Solubles de alfalfa <sup>a</sup> .....	0,06	0,47
LPC blanco <sup>b</sup> .....	0,12	0,97
Solubles de alfalfa <sup>b</sup> .....	0,20	1,17

a, b Coagulación y lavado a pH 6,0 y 8,5 respectivamente.

TABLA 2

DISTRIBUCION DE SAPONINAS (SOBRE MATERIA SECA) Y MATERIA SECA DURANTE LA PREPARACION Y FRACCIONAMIENTO DE LPC DE ALFALFAS DE BAJO Y ALTO NIVEL DE SAPONINAS

Productos	Alfalfa de bajas saponinas		Alfalfa de altas saponinas	
	Rendimiento materia seca (%)	Saponinas recuperadas (%)	Rendimiento materia seca (%)	Saponinas recuperadas (%)
Residuo prensado .....	80,3	86,8	76,0	65,0
LPC verde <sup>a</sup> .....	8,7	5,8	11,1	22,1
LPC blanco <sup>a</sup> .....	1,5	2,7	1,6	6,0
Solubles de alfalfa <sup>a</sup> .....	9,5	4,7	11,3	6,9
LPC blanco <sup>b</sup> .....	—	—	1,9	2,2
Solubles de alfalfa <sup>b</sup> .....	—	—	10,5	15,0

<sup>a, b</sup> Coagulación a pH 6,0 y 8,5 respectivamente.

Los análisis de saponinas se llevaron a cabo por el procedimiento de LIVINGSTON *et al.* (1977). Las muestras se analizaron por duplicado, a tres niveles, utilizando un ensayo con Tricodernia, comparando los resultados con los de patrones de saponinas por regresión.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra el contenido en saponinas de los productos preparados con cultivares de alfalfa de alto y bajo nivel de saponinas. La concentración de éstas en ambos casos era superior en los LPC completos que

TABLA 3

EFFECTO DEL pH DE LA COAGULACION Y LAVADO SOBRE EL CONTENIDO EN SAPONINAS DEL LPC BLANCO

pH de coagulación	pH de lavado	Contenido en saponinas (%) <sup>b</sup>
6,0	4,5	1,09 (0,92-1,28) <sup>c</sup>
6,0	6,0	0,55 (0,29-0,81)
6,0	8,5	0,57 (0,40-0,75)
8,5	4,5	0,46 (0,29-0,63)
8,5	6,0	0,47 (0,30-0,64)
8,5	8,5	0,24 (0,20-0,29)

<sup>a</sup> El contenido en saponinas de la alfalfa entera era de 0,25% lím. conf. al 95 %: 0,20-0,29 %.

<sup>b</sup> Sobre materia seca.

<sup>c</sup> Entre paréntesis, lím. conf. al 95 %.

en los LPC verdes (Pro-Xan II) y siempre mayor en los LPC coagulados y lavados a pH 6,0. Coagulando y lavando a pH 8,5, el contenido en saponinas del LPC blanco se reducía considerablemente, siendo inferior al de la alfalfa de partida. El problema de la complejación de las saponinas con las proteínas puede resolverse, en gran medida, coagulando y lavando la proteína a pH alcalino (8,5).

Como se pone de manifiesto en la tabla 2, la mayor parte de la materia seca y de las saponinas quedan en el residuo prensado. Aunque los LPC coagulados a pH 6,0 contenían sólo 1,5 y 1,6 % de materia seca, en ellos se recuperaba mayor proporción de saponinas que en los otros productos proteicos.

La tabla 3 presenta los efectos de la variación del pH de la coagulación y lavado en el contenido de saponinas del LPC blanco. Como podía esperarse, debido a los grupos carboxilo de las saponinas biológicamente activas y a su solubilidad mayor en solución alcalina, el LPC blanco preparado a pH 8,5 contenía menos saponinas que los obtenidos a pH inferior. Parece ser, pues, que el pH de la coagulación juega el papel más importante, ya que el LPC blanco coagulado a pH 8,5 contenía menos de la mitad de saponinas que el coagulado a pH 6,0 y lavado a pH 8,5.

TUNG *et al.* (33) prepararon un producto seco del jugo completo de alfalfa de altas y bajas saponinas, para experiencias de alimentación con pollitos de un día. Estas preparaciones contenían todos los componentes solubles de las hojas, así como las proteínas. La mayoría de los LPC se preparan coagulando y separando la proteína del jugo antes de secarlo, eliminando así la mayor parte de los sólidos solubles en el jugo. En tal estudio, la ganancia en peso de los pollitos se reducía en más del 50 % al alimentarlos con ese jugo completo desecado procedente del primer corte de alfalfa de alto contenido en saponinas, y casi en la misma proporción usando el segundo corte.

Estudios preliminares en alimentación de aves, en nuestro Laboratorio, y ensayos en colaboración sobre alimentación de cerdos demostraron que

TABLA 4

GANANCIA EN PESO DE POLLITOS Y EFICIENCIA ALIMENTARIA  
(GANANCIA/ALIMENTO) (1)

Ración	Ganancia media por pollito (g) (2)	Eficiencia alimentaria (3)
Maíz-Soja .....	578 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>
5 Pro-Xan .....	577 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>
10 % Pro-Xan .....	567 <sup>a</sup>	0,684 <sup>b</sup>
20 % Pro-Xan .....	569 <sup>a</sup>	0,669 <sup>c, d</sup>
20 % Pro-Xan + Lisina .....	557 <sup>a</sup>	0,683 <sup>b, c</sup>
20 % Pro-San + Lisina + Colesterol .....	581 <sup>a</sup>	0,676 <sup>b, c, d</sup>
20 % Pro-Xan + K + Mg .....	578 <sup>a</sup>	0,668 <sup>d</sup>

(1) KUZMICKY, *et al.*, 1971.

(2) Pollitos machos (white-rock) de un día se alimentaron durante 7 días con la ración maíz-soja, siguiendo con la ración experimental durante 19 días. Se hicieron 4 ensayos con 7 pollitos por ensayo para cada ración. El peso medio de cada pollito al inicio fue de 126 g.

(3) Las medias no seguidas de la misma letra son significativamente diferentes.

TABLA 5

RESULTADOS EN EL CRECIMIENTO-ACABADO DE CERDOS.  
ALIMENTADOS CON APC (CONCENTRADO PROTEICO DE ALFALFA) (1)

Tratamiento	Ganancia media diaria (g)	Relación alimento/ganancia
Control	1.003	3.41
5 % APC	903	2.96
10 % APC	1.067	3.16
15 % APC	908	3.42
20 % APC	881	3.29
24 % APC	985	3.47

(1) MYER *et al.*, 1975.

TABLA 6

RESULTADOS EN CRECIMIENTO-ACABADO DE CERDOS ALIMENTADOS CON APC  
(CONCENTRADO PROTEICO DE ALFALFA) (1)

Tratamiento	Ganancia media diaria (g)	
	Crecimiento	Acabado
Control (alfalfa henificada) .....	623 <sup>a</sup>	804
Control (alfalfa deshidratada) .....	595 <sup>a</sup>	799
7 % APC .....	572 <sup>a</sup>	726
14 % APC .....	690 <sup>b</sup>	808
20 % APC .....	767 <sup>b</sup>	831

<sup>a</sup> Difiere significativamente de b a  $P < 0.05$ .

(1) MYER, *et al.*, 1975.

TABLA 7

CONTENIDO EN SAPONINAS DE HARINAS DE ALFALFA

Variedad y origen	Métodos de secado	% saponinas	Lím. conf. 95 %
Lahontan-Kansas .....	Deshidratada	0.19	0.16-0.25
Northrup King Thor-Kansas	Deshidratada	0.67	0.54-0.86
California - Common .....	Deshidratada	0.21	0.09-0.34
Kansas Common .....	Deshidratada	0.58	0.46-0.75
Ranger - Nebraska .....	Deshidratada	0.55	0.42-0.73
Lahontan - Nevada .....	Henificada	0.37	0.25-0.52
Lahontan-California .....	Deshidratada	0.16	0.12-0.20
Lahontan - California .....	Liofilizada	0.11	0.08-0.14
Ranger-baja en saponinas .....	Deshidratada	0.14	0.12-0.16
Ranger-alta en saponinas .....	Deshidratada	1.71	1.33-2.11

los efectos inhibidores sobre el crecimiento, por las saponinas del LPC, no son importantes (tabla 4), siendo la mayoría de los sólidos solubles eliminados durante el proceso. KUZMICKY *et al.* (19), encontraron que no había diferencias significativas en la ganancia en peso de pollos alimentados con maíz-soja únicamente y con 27 % o 54 % de LPC. Aunque la dieta con 54 % de LPC producía heces más húmedas, la adición de coles-terol no incrementaba las ganancias.

MYER *et al.* (24) sustituyeron a la harina de soja por LPC en raciones para crecimiento-acabado de cerdos (tabla 5). En uno de los ensayos se incluyó el LPC a niveles de 0,5, 15, 20 y 24 % en una dieta base de cebada, siendo el crecimiento en todos ellos excelente, poniendo de manifiesto que el LPC puede sustituir a la soja en raciones de engorde. En un segundo estudio se alimentaron cerdos (10 por tratamiento), haciendo dos controles (alfalfa deshidratada al 7 % y alfalfa henificada al 7 %) y niveles de 14 y 20 % de LPC en una dieta base de maíz. En la fase de acabado los niveles fueron de 5 % de alfalfa y 5, 11 y 16 % de LPC.

Dado que no se conocen los análisis de saponinas de los citados ensayos de KUZMICKY en pollos y de CHEEKE en cerdos, sus resultados positivos pueden ser atribuidos a que utilizaron variedades comerciales de alfalfa (Lahontan) de bajo contenido en saponinas. Pero, a pesar de esto, sigue siendo deseable minimizar el posible contenido en saponinas del LPC por coagulación y lavado a pH 8,5. Es también interesante utilizar variedades de alfalfa de conocido bajo nivel de saponinas. En la tabla 7 se muestran los análisis de saponinas de una serie de variedades comerciales de alfalfa de diversos lugares de USA. La amplia gama del contenido en saponinas pone claramente de manifiesto la importancia de llevar a cabo análisis de saponinas en las alfalfas de las que vaya a prepararse LPC, utilizando para esto sólo aquéllas que presenten bajo contenido en saponinas biológicamente activas.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) ANDERSON, J. O., 1957: *Poultry Sci.*, **36**, 873.
- (2) BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., DEFREMERY, D., EDWARDS, R. H., KNUCKLES, B., MILLER, R. E., SAUNDERS, R. M., KOHLER, G. O., 1975: *Nutritional evaluation of alfalfa leaf protein concentrate*. In «Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds», vol. 1, part. 2, FRIEDMAN, M., Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, p. 319.
- (3) BICKOFF, E. M., DEFREMERY, D., EDWARDS, R. H., KNUCKLES, B. E., KOHLER, G. O., and MILLER, R. E. *Preparation of soluble edible protein from leafy green crops*. U. S. Pat. 3, 959, 246.
- (4) BIRK, Y., BONDI, A., GESTETNER, B., ISHAA, I., 1963: *Nature*, **197**, 1089.
- (5) CHEEKE, P. R., 1974: *Nutr. Rep. Int'l.* **9**, 267.
- (6) CHEEKE, P. R., KINZELL, J. H., DEFREMERY, D., KOHLER, G. O., 1977 a: *J. Anim. Sci.*, **44**, 772.
- (7) CHEEKE, P. R., KINZELL, J. H., PEDERSON, M. W., 1977 b: *J. Anim. Sci.*, **46**, 476.
- (8) CHEEKE, P. R., MYER, R. O., 1973: *Feedstuffs*, **45** (51), 24.
- (9) DEFREMERY, D., MILLER, R. E., EDWARDS, R. H., KNUCKLES, B. E., BICKOFF, E. M., KOHLER, G. O., 1973: *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 886.
- (10) DJERASSI, Carl, THOMAS, D. B., LIVINGSTON, A. L., TOMPSON, C. R., 1957: *J. Amer. Chem Soc.*, **79**, 529.
- (11) EDWARDS, R. H., MILLER, R. E., DEFREMERY, D., KNUCKLES, B. E., BICKOFF, E. M., KOHLER, G. O., 1975: *J. Agric. Food Chem.* **23**, 620.

- (12) EDWARDS, R. H., DE FREMERY, D., MACKAY, B. E., KOHLER, G. O., 1977: Transactions ASAE, **20**, 423.
- (13) GESTETNER, B., 1971: Phytochem., **10**, 2221.
- (14) KNUCKLES, B. E., DE FREMERY, Donald, KOHLER, G. O., 1976: J. Agric. Food Chem., **24**, 1177 (1976).
- (15) KOHLER, G. O., BICKOFF, E. M., SPENCER, R. R., WITT, S. C., KNUCKLES, B. E., 1968. Tech. Alfalfa Conf. Proc., 10 th ARS-74-46, 71.
- (16) KOHLER, G. O. and KNUCKLES, B. E. May 1977. *Food Tech.* 191.
- (17) KUZMICKY, D. D., KHLER, G. O., 1977: Poultry Sci., **56**, 1510.
- (18) KUZMICKY, D. D., LIVINGSTON, A. L., KNOWLES, R. E., KOHLER, G. O., GUENTHER, E., OLSON, O. E., CARLSON, C. W., 1977. Pultry Sci., **56**, 1504.
- (19) KUZMICKY, D. D., KOHLER, G. O., BICKOFF, E. M. July 29, 1971.: 11th Tech. Alfalfa Conf. Proceedings, 58.
- (20) LIVINGSTON, J., 1959: Org. Chem. **24**, 1567.
- (21) MALINOW, M. R., McLAUGHLIN, P., KOHLER, G. O., LIVINGSTON, A. L. 1977 A: Steroids, **29**, 105.
- (22) MALINOW, M. R., McLAUGHLIN, KOHLER, G. O., LIVINGSTON, A. L., 1977 b: Clin. Res., **25**, A 97.
- (23) MALINOW, M. R., McLAUGHLIN, P., STAFFORD, C., KOHLER, G. O., LIVINGSTON, A. L.: 1978. Int. Conf. on Atherosclerosis, Carlson, L. A., Ed. Raven Press, N. Y., 1978.
- (24) MYER, R. O., CHEEKE, P. R. KENNICK, W. H. 1975: J. Anim. Sci., **40**, 885.
- (25) PEDERSON, M. W., ZIMMER, D. E., McALLISTER, D. R., ANDERSON, J. O., WILDING, M. D., TAYLOR, G. A., McGUIRE, C. F. 1967: Crop Sci., **7**, 349.
- (26) PEDERSON, M. W., WANG, L. C., 1971: Crop Sci., **11**, 833.
- (27) PETERSON, D. W., 1950: J. Biol. Chem., **188**, 647.
- (28) PIRIE, N. W., 1966: Sci., **152**, 1701.
- (29) PIRIE, N. W., 1971: «*Leaf protein: Its agronomy, preparation, quality and use*». IBP Handbook 20, Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh.
- (30) RESHEF, F., GESTETNER, B., BIRK, Y., BONDI, A., 1976: J. Sci. Food Agric., **27**, 63.
- (31) SHANEY, S., GESTETNER, B., BIRK, BONDI, A., KIRSON, I., 1972: Israel J. Chem., **10**, 881.
- (32) STAHMANN, M. A., 1968: Econ. Botany, **22**, 73.
- (33) TUNG, J. Y., STRAUB, R. J., SCHOLL, J. M., SUNDE, M. L., 1977: Paper 77—1010, presented at An. Meeting Amer. Soc. Agr. Eng., N. Carolina State Univ., June 26-29.
- (34) WALTER, E. D., VANATTA, G. R., THOMPSON, C. R., MACLAY, W. D., 1954: J. Amer. Chem. Soc., **76**, 2271.

MINIMIZING THE EFFECTS OF SAPONINS IN ALFALFA LEAF PROTEIN CONCENTRATES ON POULTRY AND SWINE

#### SUMMARY

Alfalfa leaf protein concentrates (ALPC) were prepared from both low and high saponin alfalfa cultivars. Saponin tended to be concentrated in the protein fractions at higher levels than in the original alfalfa unless coagulation and washing of the protein were done at an alkaline pH. Sixty-five to 87 % of the total saponin remained in the press cake following dejuicing.

Preparation of protein fractions from a low saponin cultivar resulted in saponin levels of less than 0.07 % compared to a saponin content of 1.33 % in the protein prepared from a high saponin alfalfa cultivar. A review of swine feeding studies showed that ALPCs could provide excellent results in grower/finisher rations. No detectable saponin problem for broilers was found in ALPCs prepared from commercially grown low saponin alfalfa.