



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA

### **CONTRATO DE INVESTIGACIÓN Art. 83**

**Entre:** EQUINOCOL S.L. y la Universidad Complutense de Madrid.

**Título:** Utilización de germinados en alimentación animal: valoración nutritiva.

**Código:** 4155788. Equinocol, S.L. 062/2015.

**Equipo investigador:** Almudena Rebolé Garrigós, Luis Tomás Ortiz Vera, María Luisa Rodríguez Membibre y Susana Velasco Villar. Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UCM.

**Fecha de firma del contrato:** 14 de julio de 2015.

### **INFORME FINAL**

### **DESCRIPCIÓN Y RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA**

#### **Introducción**

El proceso de germinación determina algunos cambios en las características nutritivas de las semillas debido al desdoblamiento de algunas moléculas complejas (proteína, almidón) por acción de las enzimas, dando lugar a moléculas más simples de más fácil digestibilidad (aminoácidos, glucosa).

Con el fin de estudiar la posibilidad de empleo de germinados de distintas semillas y su valor nutritivo en alimentación animal, se ha procedido al estudio del poder germinativo, capacidad de enraizamiento y rendimiento en biomasa de algunas semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas. Además, se ha estudiado la composición químico-bromatológica para deducir cuál es la fase óptima de aprovechamiento de los germinados en los distintos estados de germinación como recursos forrajeros innovadores.

#### **Material y Métodos**

El estudio de la influencia del proceso de germinación sobre la composición química se ha llevado a cabo en las siguientes semillas: cebada, trigo, guisante, haba, veza, yero y girasol. Tanto las semillas como los germinados de 6 días fueron suministrados por la empresa EQUINOCOL, S.L.

Las semillas estudiadas fueron: cebada (*Hordeum distichon* L), trigo (*Triticum aestivum*), guisante (*Pisum sativum* L.), haba (*Vicia faba* var. *equina*), veza (*Vicia sativa* L.), yero (*Vicia ervilia* Willd.) y girasol (*Helianthus annuus* L.). Se tomaron

muestras representativas de estas semillas, moliéndose a 1 mm y conservándose a -20°C hasta su posterior análisis.

Estas semillas se sometieron a un tratamiento con una disolución al 0.07% de hipoclorito de sodio durante 30 min., lavándose a continuación con agua y colocándose en bandejas de plástico (13.0 m x 2.5 m x 2.5 m) en una cámara de germinación propiedad de la empresa Eginocol, S.L., con riego automático y temperatura, humedad e iluminación controladas durante todo el proceso de germinación (6 días). Al final del periodo de germinación, se tomaron muestras representativas al azar de cada uno de los germinados, que se liofilizaron a continuación y se molieron a 1 mm para su posterior análisis, conservándose en recipientes de plástico a -20°C.

El poder de germinación o facultad germinativa de una semilla, que expresa el porcentaje de semillas puras capaces de germinar, se determinó separando de la muestra de semillas series de 100 semillas que se colocaron en cápsulas de Petri provistas de papel de filtro y que se introdujeron en una estufa de germinación bajo las condiciones adecuadas de aireación, temperatura y humedad, en la oscuridad o a la luz según las semillas. El resultado obtenido se expresó como porcentaje de semillas en condiciones de ser plantas, que indica el poder germinativo de las semillas.

El contenido en humedad, cenizas, proteína bruta (N x 6,25), grasa bruta y fibra bruta fue determinado aplicando los métodos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). El almidón se cuantificó utilizando el método polarimétrico de Ewers (BOE, 2000) y la técnica enzimática utilizando el kit de análisis de Megazyme, procedimiento K-TSTA 10/15 (Megazyme International, Ireland 2015), midiéndose la glucosa liberada mediante colorimetría.

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo mediante derivatización con *o*-ftaldialdehído en precolumna (Jones et al., 1981) tras la hidrólisis de la muestra con HCl 6N a 110°C durante 22 h en tubos de vidrio en los que previamente se eliminó el aire. Los aminoácidos de los hidrolizados se separaron, identificaron y cuantificaron utilizando un HPLC 1100 (Agilent Technologies GmbH, Walbronn, Alemania) equipado con un detector de fluorescencia y una columna C-18 en fase reversa (Hypersil AA-ODS).

Para el análisis de ácidos grasos, se tomaron alícuotas del extracto de grasa bruta y se metilaron con una mezcla de trifluoruro de boro (en metanol al 10%), hexano y metanol (35:20:45, v/v/v) (Morrison and Smith, 1964). La separación de los ésteres metílicos se realizó con una columna capilar Tecknokroma SupraWax-280 y un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA), equipado con inyector y detector de ionización de llama. Como estándar interno se utilizó ácido pentadecanoico (Sigma-Aldrich Química, S.A., Alcobendas, Spain). La concentración relativa de los ácidos grasos se expresó como g kg<sup>-1</sup> del total de ácidos grasos. Se calculó el contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), ácidos

grasos poliinsaturados (PUFAs), ácidos grasos saturados (SFAs) y la relación PUFA/SFA.

### Resultados y Discusión

El poder de germinación obtenido para estas semillas ha sido del 100% en cebada, algo menor en trigo y yero, siguiendo a continuación veza y girasol y, por último, guisante y haba. El rendimiento en biomasa es máximo para girasol y cebada, siguiéndole trigo, guisante, veza y yero, y en último lugar, haba.



Figura 1. Semillas germinadas de cebada, yeros y girasol

En colaboración con la empresa, se ha deducido que la fase óptima de aprovechamiento de los germinados es a los 6 días, de acuerdo a la biomasa obtenida y la composición química.



Figura 2. Germinado cebada a los 6 días

Los valores de materia seca de los germinados oscilan entre 767,87% para el haba y 84,08% para el yero (Tabla 1).

Tabla 1. Humedad y materia seca de granos y germinados a los 6 días (% en MF)

	Cebada		Trigo		Guisante		Haba		Veza		Yero		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>Humedad</b>	8,85	83,36	9,04	78,57	9,24	76,7	9,04	67,87	9,48	77,19	8,78	84,08	2,78	78,91
<b>MS</b>	91,15	16,64	90,96	21,43	90,76	23,3	90,96	32,13	90,52	22,81	91,22	15,92	97,22	21,09

Los datos del análisis proximal (Tabla 2) indican una variación de composición a lo largo de los 6 días del periodo de germinación respecto a la semilla. Y así, en general, y expresando los resultados como porcentaje de la materia seca, se observa un aumento del contenido en cenizas, proteína bruta, grasa bruta y fibra bruta en el germinado comparándolo con la semilla.

**Tabla 2. Composición proximal de granos y germinados a los 6 días (% en MS)**

	Cebada		Trigo		Guisante		Haba		Veza		Yero		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>CEN</b>	2,29	2,48	1,88	2,04	2,78	2,91	3,41	3,55	3,80	4,23	3,38	3,57	2,90	3,33
<b>PB</b>	10,66	12,18	11,79	13,53	22,38	24,9	26,82	27,12	26,81	28,19	22,06	25,45	14,85	14,88
<b>GB</b>	2,45	2,64	1,86	2,38	1,42	2,20	1,26	1,46	0,99	1,91	1,39	2,06	49,23	40,07
<b>FB</b>	5,07	9,07	3,14	7,28	6,12	7,63	9,61	9,37	4,84	6,72	4,93	8,70	14,85	23,38
<b>ELN</b>	79,53	73,63	81,33	74,77	67,30	62,3	58,90	58,50	63,56	58,95	68,24	60,22	18,17	18,34

En cuanto a los componentes estructurales (Tabla 3), del sistema de análisis utilizando detergentes se deduce que las fracciones como FAD, LAD y celulosa aumentan en algunos casos (cebada), mientras que disminuyen en otros (haba).

**Tabla 3. Componentes de la fracción fibra de granos y germinados a los 6 días (% en MS)**

	Cebada		Trigo		Guisante		Haba		Veza		Yero		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>FND</b>	21,23	25,09	17,77	20,51	22,60	18,86	17,85	17,90	17,22	17,97	20,10	18,11	26,59	45,89
<b>FAD</b>	5,77	10,24	3,53	3,96	8,40	8,79	13,22	12,70	7,46	8,59	7,69	8,15	16,81	30,63
<b>HCE</b>	15,46	14,85	14,24	16,55	14,20	10,07	4,63	5,20	9,76	9,38	12,41	9,96	9,88	15,26
<b>CEL</b>	3,90	8,25	1,52	2,73	7,80	7,35	10,67	10,87	5,56	4,38	7,10	5,59	11,40	24,96
<b>LAD</b>	1,87	1,99	2,01	1,23	0,60	1,44	2,55	1,83	1,90	4,21	0,59	2,56	5,41	5,67

Es notable la disminución del contenido en almidón en los germinados de cebada y de trigo respecto al grano (18,5 y 19,8%, respectivamente), obteniéndose variaciones ligeras en el caso de las leguminosas y un aumento en el girasol, tanto aplicando el método polarimétrico como el enzimático (Tabla 4). Como consecuencia, la proporción de azúcares solubles se incrementa en el caso de los cereales (249 y 423%, respectivamente en cebada y trigo). Este resultado puede ser relevante para la utilización de los germinados en la alimentación del caballo y su posible repercusión en el descenso de la frecuencia de cólicos. La disminución del contenido en  $\beta$ -glucanos en el germinado de cebada respecto al grano es del 50,6%, resultado importante ya que los  $\beta$ -glucanos son considerados factores antinutritivos en los animales monogástricos.

**Tabla 4. Carbohidratos no estructurales de granos y germinados a los 6 días (% en MS)**

	Cebada		Trigo		Guisante		Haba		Veza		Yero		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>AS</b>	7,02	24,49	4,36	22,81	7,18	7,26	5,49	6,93	5,59	8,36	10,34	16,11	3,84	7,51
<b>ALM</b>	57,60	46,94	61,63	49,40	41,89	40,55	42,65	38,76	38,42	37,98	37,54	31,76	0,65	4,30
<b><math>\beta</math>-GLU</b>	3,20	1,58	0,78	1,08	0,09	0,08	0,04	0,34	0,22	0,15	0,31	0,48	1,05	0,90

Para el estudio del perfil de aminoácidos y de ácidos grasos se eligieron tres semillas: un cereal, cebada; una leguminosa, guisante; y la oleaginosa, girasol. En cuanto a los aminoácidos (Tabla 5), no se observa apenas variación en el contenido en aminoácidos esenciales al comparar el germinado con el grano, excepto en el caso de lisina y treonina, produciéndose un incremento del 32.6 y 32.1% en cebada y girasol en el caso de la lisina y del 20,7% en guisante en el caso de la treonina, como consecuencia de la germinación. Debido al aumento del contenido en proteína bruta en el germinado, podría pensarse en un aumento del contenido en nitrógeno no proteico, lo que sería un tema de interés para una futura investigación.

**Tabla 5. Aminoácidos de granos y germinados a los 6 días (% en MS)**

	Cebada		Guisante		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>ASP</b>	0,77	1,30	2,36	2,90	1,79	1,86
<b>GLU</b>	2,42	1,78	3,19	3,56	3,37	3,06
<b>SER</b>	0,54	0,51	1,04	1,40	0,84	0,88
<b>HIS</b>	0,27	0,27	0,49	0,63	0,35	0,44
<b>GLY</b>	0,47	0,49	0,88	1,60	0,35	0,93
<b>THR</b>	0,42	0,47	0,82	0,99	0,73	0,78
<b>ALA</b>	0,53	0,62	0,88	1,24	0,80	0,87
<b>ARG</b>	0,6	0,59	2,06	2,11	1,47	1,46
<b>TYR</b>	0,37	0,37	0,72	0,90	0,54	0,58
<b>VAL</b>	0,51	0,57	0,87	1,13	0,90	0,91
<b>MET</b>	0,18	0,19	0,21	0,31	0,32	0,33
<b>PHE</b>	0,59	0,54	1,09	1,27	0,87	0,83
<b>ILE</b>	0,46	0,49	0,95	1,12	0,77	0,79
<b>LEU</b>	0,78	0,77	1,47	1,81	1,11	1,20
<b>LYS</b>	0,43	0,57	1,43	1,66	0,56	0,74

**Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (% del total) y contenido en polifenoles (% en MS) de granos y germinados a los 6 días**

	Cebada		Guisante		Girasol	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
<b>C16:0</b>	20,14	20,57	10,99	11,04	6,41	6,76
<b>C18:0</b>	1,65	1,86	3,73	4,33	3,29	3,27
<b>C18:1 n-9</b>	15,10	11,28	24,53	16,37	28,28	21,86
<b>C18:1 n-7</b>	0,65	0,60	0,60	0,71	0,65	0,70
<b>C18:2 n-6</b>	56,65	55,63	48,28	56,11	60,88	65,59
<b>C18:3 n-3</b>	4,52	9,13	9,63	8,92	0,12	0,39
<b>C20:0</b>	0,65	0,52	0,9	1,09	0,26	0,21
<b>SFA</b>	22,44	22,95	15,62	16,45	9,96	10,23
<b>MUFA</b>	15,76	11,88	25,13	17,07	28,93	22,55
<b>PUFA</b>	61,17	64,76	57,91	65,02	61,01	66,08
<b>TUFA</b>	76,93	76,64	83,04	82,09	89,94	88,63
<b>PUFA/SFA</b>	2,73	2,82	3,71	3,95	6,13	6,46
<b>Polifenoles</b>	0,18	0,39	0,19	0,28	0,66	0,39

El perfil de ácidos grasos de cebada, guisante y girasol (Tabla 6) muestra un incremento del contenido en PUFA del 12,3% en guisante y una disminución del contenido en MUFA del 24,6% en cebada, 32,1% en guisante y 22,1% en girasol. Además, se observa un aumento en la proporción de C18:2 n-6 en guisante (16,2%) y girasol (7,7%) y de C18:3 n-3 en cebada (102%). El contenido en polifenoles (Tabla 6) aumentó en los germinados de cebada y de guisante, si bien disminuyó en el de girasol.

### **Conclusiones**

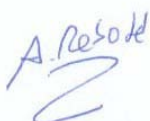
Puede concluirse que se han logrado los objetivos propuestos y que el conocimiento de la composición química del germinado de 6 días puede explicar, en parte, los procesos ocurridos durante el proceso germinativo. La disminución del contenido en almidón y  $\beta$ -glucanos en el germinado de cebada, el aumento del contenido en PUFA y el posible incremento del contenido en compuestos de nitrógeno no proteico en varios de los germinados estudiados hacen interesante la utilización de estos recursos vegetales en la alimentación animal, pudiéndose formular germinados mixtos de cereal-leguminosa, cereal-girasol, como alimentos más completos. Sería interesante continuar con esta investigación y estudiar la presencia de posibles componentes con poder antioxidante que proporcionarían a estos germinados propiedades funcionales.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis*, 16 edn (Arlington, VA, Association of Official Analytical Chemists International).
- BOE (2000) *Métodos Oficiales de Análisis de Piensos o Alimentos para Animales y sus primeras materias*. Anexo 34. Determinación del almidón. 17 de febrero de 2000.
- Jones, B.N., Paäbo, S. & Stein, S. (1981). Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved *o*-phtaldialdehyde precolumn labeling procedure. *Journal of Liquid Chromatography*, 4, 565-586.
- Morrison, W.R., & M.L.Smith (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.

**Como investigador responsable de este Contrato de Investigación, he informado a la empresa Equinocol, S.L. de todos los resultados obtenidos y, conjuntamente, hemos extraído conclusiones importantes para el uso de este recurso vegetal en alimentación de caballos e, incluso, en otras especies ganaderas (rumiantes, aves), así como la posibilidad de una futura investigación sobre otros compuestos minoritarios que pueden proporcionar a estos germinados propiedades funcionales.**

**Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Madrid, a 13 de julio de 2016.**



Fdo. Almudena Rebolé Garrigós