

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Tesi Doctoral

**ESTIMACIÓN DE LA DEGRADABILIDAD RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD
INTESTINAL DE LOS AMINOÁCIDOS DE SUPLEMENTOS PROTEICOS IN
VITRO**

Sílvia Gargallo Ridao

Març del 2006

**ESTIMACIÓN DE LA DEGRADABILIDAD RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD
INTESTINAL DE LOS AMINOÁCIDOS DE SUPLEMENTOS PROTEICOS IN
VITRO**

Tesi doctoral presentada per:

Sílvia Gargallo Ridao

Sota la direcció de:

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

Per a optar al grau de Doctor en el programa de Producció Animal de la

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Bellaterra, Març del 2006

Sergio Calsamiglia Blancafort, Professor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifica:

Que la memòria titulada **“Estimación de la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de aminoácidos de suplementos proteicos in vitro”** presentada per **Sílvia Gargallo Ridaó** es va realitzar sota la seva direcció i, considerant que compleix amb les condicions exigides per a optar al Grau de Doctor en el programa de Producció Animal que concedeix la Universitat Autònoma de Barcelona, autoritza la seva dissertació pública per a que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I, per que així consti, firma la present a Bellaterra, 30 de Març del 2006.

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

AGRAÏMENTS

No podria començar aquest apartat d'una altra manera que no fos dirigint-me al director d'aquesta tesi: Sergi, gràcies per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, per creure en mi, per la teva dedicació... però sobretot per haver estat sempre tan pacient i comprensiu i per animar-me en tot moment a continuar endavant. Igualment vull agrair a l'Alfred el suport, la confiança i els bons consells que sempre ha sabut donar i que són mereixedors d'un gran afecte.

Vull dedicar també un agraïment sincer a la Maria Devant, a la María Rodríguez i al Paul. Amb ells vaig descobrir el món dels fermentadors i em van transmetre tant la seva empenta que m'hi vaig quedar. Després van arribar la Lorena i la Marta, sempre disposades a donar un cop de mà i a demostrar-me la seva amistat. Ha sigut una gran satisfacció poder treballar amb aquest equip. Aquest agraïment el vull fer extensiu també al Blas i a la Rosa i a tot el personal del departament (professors, becaris, personal de la granja, secretaria, etc.) que d'una manera o altra han col·laborat en la realització d'aquest treball.

Vull agrair a l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina "Vicent Villar Palasí" i especialment al Quico Canals per oferir-me les seves instal·lacions i els seus coneixements a l'hora de realitzar l'anàlisi d'aminoàcids.

Als meus companys i amics: Paul, Lorena, Bego, Marta, Toni, Gerardo i Vikki, gràcies per compartir moments tan importants a la meua vida, dins i fora de la feina. Tampoc vull oblidar-me d'altres companys com Luciano, Aina, Ahmed, Moez, Cristóbal, Montse, Marta B., Amine, Ana Raquel, Mari Carmen, Martha Liliana, Nacho, Glauber i tots aquells a qui potser no he esmentat. Gràcies a tots.

Finalment, l'agraïment més especial el vull dedicar a la meua família, el més important que tinc. Als meus pares i al meu germà, per ser la meua base i permetre'm ser el que sóc i com sóc. Al Quim pel seu amor i suport incondicionals i per tots els projectes que compartim. Al meu fill Guillem, la meua font d'il·lusió.

La realització dels estudis de tercer cicle que culminen amb la presentació d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a:

- La Universitat Autònoma de Barcelona, per donar-me l'oportunitat de realitzar els estudis de Tercer Cicle.
- La Generalitat de Catalunya, per concedir-me una beca FPI des de Gener del 2000 fins al Desembre del 2003.
- La Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (**Proyecto CICYT AGF 97-0444**), pel suport financer per a la realització del primer i segon experiment.

RESUMEN

Los actuales sistemas de formulación para vacuno lechero se basan en el concepto de proteína digestible y en especial en el aporte de aminoácidos absorbibles en el intestino delgado. En la vaca lechera de alta producción el aporte de proteína microbiana no es suficiente para cubrir las necesidades del animal, por lo que es frecuente recurrir al uso de fuentes de proteína no degradable en el rumen. Esto significa que una proporción importante de los aminoácidos que llegan al intestino delgado del rumiante provienen de la proteína de la ración. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los monogástricos, antes de llegar al intestino esta proteína es sometida a la acción de los microorganismos del rumen. Varios autores (Crooker y col., 1987; Susmel y col., 1989; Erasmus y col., 1994) han observado cambios en el perfil de aminoácidos de la proteína tras su paso por el rumen, aunque los efectos que produce la fermentación ruminal sobre el perfil de aminoácidos de la proteína de la ración no están muy claros. La proteína que no ha sido degradada en el rumen fluye hacia el intestino delgado donde debe ser digerida. De forma similar a lo que ocurre con la degradación en el rumen, existe poca información acerca de cómo afecta la digestión intestinal a los diferentes aminoácidos que componen una proteína. La incorporación de valores de degradación ruminal y digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales de suplementos proteicos permitiría una mejora evidente en la precisión de los sistemas de formulación de raciones para vacuno lechero. La obtención de valores precisos *in vivo* es difícil, dada la complejidad de la fermentación ruminal y la dificultad de controlar los factores de variación inherentes al animal que pueden confundir la interpretación de los resultados, por lo que en el presente trabajo se optó por la utilización de sistemas *in vitro*. El

objetivo principal de este trabajo fue la estimación de la degradabilidad ruminal y la digestibilidad intestinal de los aminoácidos de algunos suplementos proteicos utilizados frecuentemente en vacuno lechero. A la vez se evaluaron los efectos de la incorporación a las raciones de niveles crecientes de proteína de baja degradabilidad ruminal sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes.

Los experimentos 1 y 2 se realizaron con el fin de estudiar los efectos de la inclusión en las raciones de niveles crecientes de proteína no degradable en el rumen procedente de suplementos proteicos sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes y, a la vez, estimar el escape relativo del rumen de los aminoácidos de estos suplementos. El diseño experimental fue idéntico para ambos experimentos y sólo variaron las fuentes de proteína no degradable estudiadas. En concreto, en el primer experimento se estudiaron dos suplementos de origen vegetal: la harina de soja tratada por calor (HSBM) y el corn gluten meal (CGM); mientras que para el segundo experimento se eligieron dos suplementos proteicos de origen animal: la harina de pescado (FM) y la harina de sangre (BM). En ambos experimentos se utilizaron 8 fermentadores (1320 ml) de doble flujo continuo en tres períodos de 8 días (5 d de adaptación y 3 d de muestreo). En cada uno de los experimentos se diseñaron 8 raciones isonitrogenadas (4 para cada suplemento) consistentes en una mezcla basal de ingredientes (71% de la MS) igual para todas ellas, a la que se le añadió una suplementación de proteína (29% de la MS) correspondiente a cada tratamiento. Los diferentes tratamientos contenían una proporción del N en forma de N no proteico (urea y triptona) y el resto (el 0, 33, 66, o el 100% según el tratamiento) fue aportado por el suplemento proteico en estudio (HSBM, CGM, FM o BM). Las raciones tenían un contenido elevado de proteína (22%) para asegurar que todas ellas dispusieran de

suficiente proteína degradable como para no afectar a la síntesis bacteriana y, a la vez, poder aportar cantidades suficientemente elevadas de cada suplemento proteico como para observar cambios en los flujos de aminoácidos. La mezcla basal se formuló con el objetivo de asegurar una fermentación bacteriana similar en todos los tratamientos, ya que el diseño experimental requería que el flujo de N bacteriano fuera constante para poder atribuir los cambios observados en los flujos de aminoácidos al suplemento proteico utilizado en cada caso. Estas raciones (95 g de MS/d) fueron administradas de forma semicontinua a los fermentadores, en los que se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura (39°C), pH (6.4), tasa de dilución de sólidos (5%/h) y tasa de dilución de líquidos (10%/h). Las muestras se recogieron de los efluentes de los tres días de muestreo, y las bacterias se aislaron del contenido de cada fermentador el último día de cada período para su posterior análisis químico. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la digestión de la materia orgánica provocada por la incorporación de niveles elevados de HSBM, aunque para el resto de tratamientos se mantuvo constante. El incremento de proteína no degradable de las raciones no afectó significativamente a la digestión de la fibra, a la concentración de ácidos grasos volátiles totales ni a las proporciones molares de acetato, propionato y butirato en ninguno de los casos. Tal como cabía esperar, la degradación de la proteína de la ración y la concentración de N amoniacal disminuyeron al aumentar el nivel de proteína no degradable de las raciones. Esta disminución fue acompañada de un aumento en el flujo de N dietario y de aminoácidos, sin que el flujo de N bacteriano ni la eficiencia de síntesis de proteína microbiana quedaran afectados por el aumento de proteína no degradable procedente del CGM, FM y BM. Sólo en el caso de la incorporación de niveles elevados de HSBM se observó un aumento en el flujo de N bacteriano y en la

eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Los resultados muestran que, en general, se consiguió no alterar la fermentación microbiana y que el flujo de N bacteriano se mantuviera constante entre los diferentes tratamientos tal como se pretendía con el diseño de las raciones. Esto permitió calcular los valores de escape ruminal relativo de los aminoácidos individuales dentro de cada suplemento a partir de la técnica de las pendientes. Los resultados de la estimación del escape ruminal relativo de los aminoácidos situaron a la tirosina, el aspártico y el glutámico como los aminoácidos más resistentes a la degradación por parte de las bacterias ruminales, resultando menos degradables que los aminoácidos totales en los cuatro suplementos estudiados (excepto en el caso del glutámico en la HSBM, donde la diferencia no llegó a ser significativa). Esta concordancia no se pudo observar a la hora de diferenciar los aminoácidos más degradables, ya que se observaron diferencias entre suplementos proteicos. Además, la variabilidad obtenida en los resultados sólo permitió detectar una degradabilidad significativamente mayor respecto al total de aminoácidos en el caso de la lisina del CGM y en la isoleucina de BM. Así, aunque los resultados sugieren que existen diferencias en la degradación de los aminoácidos individuales de los suplementos proteicos, la obtención de valores concretos es muy difícil de conseguir.

La falta de una técnica rápida y fiable que permitiera la obtención de valores de digestión intestinal no sólo de proteínas sino también de aminoácidos individuales, fue lo que motivó la realización del tercer experimento. Se partió de la técnica de los tres pasos para la determinación de la digestión intestinal de proteínas desarrollada por Calsamiglia y Stern (1995) y se realizaron algunas modificaciones para adaptar esta técnica a un incubador Daisy^{II} con el fin de reducir el coste y el trabajo derivados del procedimiento, y de obtener un residuo que nos permitiera analizar su contenido en

aminoácidos. Los resultados de las pruebas preliminares realizadas con 7 muestras de soja calentadas a 170°C durante 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8h, mostraron que el proceso mediante el Daisy^{II} permite incubar hasta 30 bolsas de nylon (Ankom R510) con 5 g de muestra en cada una por cada botella, agilizando así la estimación de la digestión intestinal de proteínas y permitiendo el análisis de aminoácidos. Igualmente el cambio en el tipo de pepsina utilizado para la técnica permitió reducir el coste de esta respecto al de la técnica de los tres pasos. Una vez establecido el nuevo procedimiento para la estimación de la digestión intestinal de proteínas y aminoácidos, este se aplicó a 12 suplementos proteicos de uso frecuente en vacuno lechero, y los resultados se compararon con los obtenidos mediante la técnica de los tres pasos, obteniéndose una elevada correlación entre ambas técnicas ($r^2 = 0.84$; $P < 0.001$). Los residuos de los 12 suplementos obtenidos mediante la técnica Daisy^{II} fueron sometidos al análisis de sus aminoácidos para comparar su perfil con el de las muestras originales y con el de las muestras tras la incubación en el rumen, y detectar los posibles cambios. El perfil de los residuos de estos suplementos tras su digestión con pepsina-pancreatina resultó ser diferente al perfil de la proteína no degradada en el rumen, indicando posibles diferencias en la digestión intestinal de los aminoácidos individuales. En concreto se observó una disminución media del 10% en la concentración de aminoácidos esenciales, lo que sugiere que estos podrían ser más digestibles en el intestino delgado que los no esenciales. Entre los aminoácidos esenciales, la arginina y la fenilalanina estuvieron entre los aminoácidos más digestibles en la mayoría de los suplementos estudiados. Para el resto de aminoácidos no fue posible establecer una tendencia general, ya que los resultados difirieron entre suplementos. Los resultados de este experimento sugieren diferencias en la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales de los

Resumen

suplementos proteicos, y apuntan a la técnica Daisy^{II} como un posible método para la obtención de valores de digestibilidad específicos para cada aminoácido.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica

1- Introducción.....	31
2- Necesidades de proteína.....	33
2.1- Necesidades proteicas de mantenimiento.....	34
2.2- Necesidades proteicas de producción.....	37
2.2.1- Necesidades proteicas para la gestación.....	37
2.2.2- Necesidades proteicas para la lactación.....	38
2.2.3- Necesidades proteicas para el crecimiento.....	38
3- Aportes de proteína.....	41
3.1- Aportes de proteína microbiana.....	42
3.2- Aportes de proteína no degradable en el rumen.....	48
3.3- Aportes de proteína endógena.....	51
4- Degradación de proteínas en el rumen.....	52
4.1- Mecanismo de degradación de proteínas en el rumen.....	52
4.2- Factores que afectan a la degradación de la proteína de la ración.....	55
4.2.1- Factores que afectan al ritmo de degradación.....	57
4.2.1.1- Características de la proteína.....	57
4.2.1.2- Tratamiento del alimento.....	59
<i>a- Tratamientos térmicos.....</i>	<i>59</i>
<i>b- Tratamientos químicos.....</i>	<i>60</i>
<i>c- Tratamientos combinados.....</i>	<i>61</i>
4.2.1.3- Actividad de las bacterias ruminales.....	63

4.2.2- Factores que afectan al tiempo de retención.....	65
4.2.2.1- Nivel de ingestión.....	66
4.2.2.2- Frecuencia de distribución del alimento.....	67
4.2.2.3- Tamaño de partícula.....	68
4.2.2.4- Relación forraje / concentrado.....	69
5- Digestión intestinal de la proteína no degradada en el rumen.....	70
6- Aminoácidos.....	75
6.1- Aminoácidos esenciales y no esenciales.....	76
6.2- Aminoácidos limitantes.....	77
6.3- Necesidades de aminoácidos.....	78
6.3.1- El método factorial.....	78
6.3.2- El método dosis-respuesta directo.....	80
6.3.3- El método dosis-respuesta indirecto.....	80
6.4- Aportes de aminoácidos.....	82
6.4.1- Variabilidad del perfil de aminoácidos del contenido intestinal.....	83
6.4.2- Aportes microbianos de aminoácidos.....	86
6.4.3- Aportes de aminoácidos a través de la proteína no degradable de la ración.....	87
6.4.3.1- Alteración del aporte de aminoácidos con suplementos proteicos.....	87
6.4.3.2- Degradación de aminoácidos en el rumen.....	88
6.4.3.3- Digestión intestinal de los aminoácidos de la ración.....	93
7- Conclusiones.....	97
8- Objetivos.....	98

CAPÍTULO 2. Experimento 1:

Rumen microbial degradation of amino acids from heat-treated soybean meal and corn gluten meal in continuous culture

1- Abstract.....	101
2- Introduction.....	102
3- Materials and methods.....	103
3.1- Diets and treatments.....	103
3.2- Continuous culture system.....	106
3.3- Sample collection.....	106
3.4- Chemical analyses.....	108
3.5- Statistical analyses.....	109
4- Results and discussion.....	110
5- Conclusions.....	124
6- Acknowledgments.....	124

CAPÍTULO 3. Experimento 2:

Rumen microbial degradation of amino acids from fish meal and blood meal in continuous culture

1- Abstract.....	127
2- Introduction.....	128
3- Materials and methods.....	129
3.1- Diets and treatments.....	129
3.2- Continuous culture system.....	132
3.3- Sample collection.....	132

3.4- Chemical analyses.....	134
3.5- Statistical analyses.....	135
4- Results and discussion.....	136
5- Conclusions.....	149
6- Acknowledgments.....	149

CAPÍTULO 4. Experimento 3:

A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of protein and amino acids

1- Abstract.....	153
2- Introduction.....	154
3- Materials and methods.....	155
3.1- Modified pepsin-pancreatin digestion procedure.....	155
3.1.1- Type of pepsin.....	155
3.1.2- Type of bags.....	156
3.1.3- Amount of sample per bag.....	157
3.1.4- Number of samples per incubation bottle.....	158
3.2- Ruminal incubation.....	158
3.3- Comparison of TSP and Daisy ^{II} protein digestibility values.....	159
3.4- Measuring intestinal digestion of amino acids.....	160
3.5- Chemical analyses.....	161
4- Results and discussion.....	162
4.1- Modified pepsin-pancreatin digestion procedure.....	162
4.1.1- Type of pepsin.....	162

4.1.2- Type of bags.....	162
4.1.3- Amount of sample per bag.....	163
4.1.4- Number of samples per incubation bottle.....	163
4.2- Ruminal incubation.....	164
4.3- Comparison of TSP and Daisy ^{II} protein digestibility values.....	165
4.4- Protocol of the Daisy ^{II} procedure.....	166
4.5- Measuring intestinal digestion of amino acids.....	168
5- Conclusions.....	171

CAPÍTULO 5. Discusión general

1- Introducción.....	175
2- Fermentación ruminal.....	176
2.1- Efectos de la degradabilidad de la proteína sobre la fermentación ruminal.....	176
2.2- Efectos de la concentración de N amoniacal sobre la fermentación ruminal....	182
3- Diseño experimental.....	199
3.1- Control de la fermentación ruminal.....	201
3.2- Análisis de aminoácidos.....	202

CAPÍTULO 6. Conclusiones.....207

CAPÍTULO 7. Referencias bibliográficas.....211

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO 1

Índice de tablas

- Tabla 1.** Estimación de las necesidades de proteína para el mantenimiento en los distintos sistemas de formulación de raciones para vacuno lechero.....36
- Tabla 2.** Estimación de las necesidades de proteína para la producción en los distintos sistemas de formulación de raciones para vacuno lechero.....39
- Tabla 3.** Proteína no degradable en el rumen de varios suplementos proteicos.....50
- Tabla 4.** Degradabilidad de varios suplementos proteicos para diferentes ritmos de flujo obtenida en animales alimentados con raciones a base de forrajes.....66
- Tabla 5.** Digestión intestinal de la proteína no degradable en el rumen de diferentes alimentos.....72
- Tabla 6.** Utilización de los aminoácidos individuales absorbidos para las distintas funciones fisiológicas.....79
- Tabla 7.** Variabilidad en la composición en aminoácidos (g/100g de AA) de la digesta intestinal en bovinos.....84
- Tabla 8.** Perfil de aminoácidos (% del total de aminoácidos esenciales) de la leche, el tejido muscular, las bacterias ruminales y algunos suplementos proteicos....86
- Tabla 9.** Escape relativo del rumen de los aminoácidos de la harina de soja, gluten de maíz, harina de sangre y harina de pescado.....91

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de la obtención de proteína metabolizable en rumiantes....40

Figura 2. Efecto del nivel de carbohidratos no fibrosos sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.....46

Figura 3. Efecto de la concentración de proteína degradable de la ración sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.....47

Figura 4. Esquema de la degradación de la proteína en el rumen.....54

CAPÍTULO 2

Índice de tablas

Table 1. Ingredients and chemical composition of diets.....105

Table 2. Effect of increasing levels of heated soybean meal or corn gluten meal on true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture.....112

Table 3. Volatile fatty acid concentrations in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal or corn gluten meal...113

Table 4. Nitrogen metabolism in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal or corn gluten meal.....116

Table 5. Amino acid composition (g/100g of total AA measured) of heated soybean meal and corn gluten meal.....117

Table 6. Amino acid flow (g/d) from continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal or corn gluten meal.....119

Table 7. Relative ruminal escape of amino acids from heated soybean meal and corn gluten meal.....122

CAPÍTULO 3

Índice de tablas

Table 1. Ingredients and chemical composition of diets.....	131
Table 2. Effect of increasing levels of fish meal or blood meal on true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture.....	137
Table 3. Volatile fatty acid concentrations in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal or blood meal.....	138
Table 4. Nitrogen metabolism in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal or blood meal.....	141
Table 5. Amino acid composition (g/100g of total AA measured) of fish meal and blood meal.....	142
Table 6. Amino acid flow (g/d) from continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal or blood meal.....	144
Table 7. Relative ruminal escape of amino acids from fish meal and blood meal.....	148

CAPÍTULO 4

Índice de tablas

Table 1. Intestinal CP digestion (%) determined by the Daisy ^{II} technique of original protein supplements samples and of rumen preincubated samples.....	165
Table 2. Changes in the EAA profile of 11 feedstuffs after a 12-h in situ ruminal incubation and after pepsin-pancreatin incubation in a Daisy ^{II} (expressed as proportion of AA escaping degradation).....	170

Índice de figuras

Figure 1. Regresión line showing the relationship between the intestinal digestión (%) of 12 protein supplements determined by the Daisy ^{II} technique and by the three-step procedure.....166

CAPÍTULO 5

Índice de tablas

Tabla 1. Proporción de aminoácidos esenciales y de aminoácidos no esenciales de las bacterias ruminales, de la harina de soja tratada por calor, del corn gluten meal, de la harina de pescado y de la harina de sangre.....182

Tabla 2. Contenido en aminoácidos de cadena ramificada (g/100g de AA totales analizados) de la harina de soja tratada por calor, del corn gluten meal, de la harina de pescado y de la harina de sangre.....190

Tabla 3. Escape ruminal relativo de los aminoácidos de cadena ramificada de la harina de soja tratada por calor, del corn gluten meal, de la harina de pescado y de la harina de sangre.....190

Índice de figuras

Figura 1. Relación entre la degradación de la proteína de la ración y la concentración de nitrógeno amoniacal.....177

Figura 2. Relación entre la degradación de la proteína de la ración y los flujos de nitrógeno bacteriano y nitrógeno dietario.....179

Figura 3. Relación entre la degradación de la proteína de la ración y el flujo de aminoácidos totales.....179

Figura 4. Relación entre la degradación de la proteína de la ración y el flujo de aminoácidos no esenciales.....	180
Figura 5. Relación entre la degradación de la proteína de la ración y el flujo de aminoácidos esenciales.....	180
Figura 6. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la digestibilidad de la fibra neutro detergente.....	184
Figura 7. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la digestibilidad de la materia orgánica.....	184
Figura 8. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y el flujo de N bacteriano.....	186
Figura 9. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana.....	188
Figura 10. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada.....	189
Figura 11. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada en la harina de soja tratada por calor...	191
Figura 12. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isobutirato en la harina de soja tratada por calor.....	191
Figura 13. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isovalerato en la harina de soja tratada por calor.....	192
Figura 14. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada en el corn gluten meal.....	192
Figura 15. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isobutirato en el corn gluten meal.....	193

Figura 16. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isovalerato en el corn gluten meal.....	193
Figura 17. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada en la harina de pescado.....	194
Figura 18. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isobutirato en la harina de pescado.....	194
Figura 19. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isovalerato en la harina de pescado.....	195
Figura 20. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada en la harina de sangre.....	195
Figura 21. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isobutirato en la harina de sangre.....	196
Figura 22. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la producción de isovalerato en la harina de sangre.....	196
Figura 23. Representación del principio de la técnica de las pendientes.....	201

CAPÍTULO 1

Revisión Bibliográfica

1- Introducción

El aumento del nivel productivo de las vacas lecheras durante los últimos años ha hecho que también aumenten sus necesidades en nutrientes tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, entre ellos la proteína. Aunque las bacterias ruminales sintetizan proteína microbiana de muy buena calidad a partir la proteína degradable de la ración, generalmente esta no es suficiente para aportar toda la proteína requerida por la vaca de alta producción. A medida que la producción aumenta, la contribución parcial de la proteína microbiana al total de aminoácidos aportados al intestino disminuye y la cantidad de proteína alimentaria que llega sin degradar al intestino delgado debe aumentar para cubrir las necesidades (NRC, 2001). La suplementación con fuentes de proteína de baja degradabilidad es una práctica frecuente para incrementar la cantidad de proteína de la ración que llega al intestino delgado para ser digerida y absorbida. Así, los sistemas de formulación han desarrollado esquemas que permiten equilibrar los aportes de proteína degradable y no degradable (NRC 1985, NRC 2001, INRA 1988).

Sin embargo, son los aminoácidos, y no la proteína *per se* los nutrientes requeridos, ya que se utilizan como bloques de construcción para la síntesis de proteínas y son imprescindibles para las funciones de mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactación de la vaca lechera. No obstante, la mejora de la precisión en la formulación de raciones requiere el conocimiento de las necesidades y los aportes, resultando en una optimización de la producción y un impacto económico positivo. En los últimos años, los sistemas de formulación han incorporado la predicción de las necesidades y aportes de aminoácidos absorbibles en el intestino (Rulquin y col., 1993; O'Connor y col., 1993;

NRC 2001) con el fin de equilibrar los aminoácidos absorbibles de las raciones. Los aportes de aminoácidos absorbibles de origen alimentario dependen de la degradabilidad de la proteína en el rumen, de la digestibilidad intestinal y del perfil de aminoácidos de la proteína digerida. Algunos autores consideran que el perfil de aminoácidos de la proteína no degradada es igual al perfil de la proteína original (Rulquin y col. 1993; NRC 2001) o al perfil de la fracción insoluble (O'Connor y col., 1993), mientras otros autores (Crooker y col., 1987; Erasmus y col., 1994) sugieren que el perfil de aminoácidos de la proteína residual después de la incubación ruminal es distinto al de la proteína original. Tras su paso por el rumen, la proteína que no ha sido degradada fluye hacia el intestino delgado donde debe ser digerida. Los sistemas de formulación actuales (O'Connor y col., 1993; NRC 2001; Rulquin y col., 2001) reconocen diferencias en la digestibilidad intestinal de la proteína entre los distintos suplementos proteicos, pero asumen un valor de digestibilidad intestinal constante para todos los aminoácidos que constituyen una misma proteína. Esta falta de diferenciación puede llevar a errores en la precisión a la hora de formular raciones en base a las necesidades de aminoácidos, y limitar la eficacia productiva del animal. La escasa información existente acerca de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales y la falta de métodos rápidos y fiables para su determinación, hacen que los sistemas de racionamiento no tengan en cuenta este aspecto a la hora de formular.

En consecuencia, es justificado profundizar en el efecto que la fermentación microbiana tiene sobre el perfil de aminoácidos de la proteína absorbible, así como en la evaluación de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos, cuyos resultados deben permitir mejorar la precisión de la formulación de raciones en el rumiante.

2- Necesidades de proteína

La vaca lechera consume proteína para aportar el N necesario para el crecimiento microbiano en el rumen y para obtener aminoácidos para el mantenimiento del animal y la producción de leche (Clark y col., 1992). Si los microorganismos ruminales o los tejidos del animal no reciben suficiente N en la forma adecuada, el crecimiento o la producción pueden verse afectados (Clark y col., 1987). Así, podríamos definir las necesidades proteicas como la cantidad de proteína que debe recibir el animal para compensar los gastos o las pérdidas de nitrógeno y a la vez asegurar la mejor eficacia de utilización de la ración, sin afectar a la salud ni a la reproducción.

Las necesidades totales de proteína en la dieta pueden calcularse mediante dos métodos diferentes. El método empírico mide la respuesta al N añadido en la dieta bien en el funcionamiento ruminal o en el rendimiento del animal. Los estudios de alimentación o de lactación permiten calcular las necesidades para varios estados, edades y niveles de producción. En estos casos, se administran raciones consideradas adecuadas en todos los aspectos salvo la proteína, determinándose la ingestión mínima de proteína necesaria para la máxima producción (McDonald y col., 1993). Las necesidades de mantenimiento se estiman extrapolando a un nivel de producción cero. Los métodos empíricos tienen la ventaja de su simplicidad y aplicación directa, aunque la extrapolación de los resultados a otras dietas o condiciones del animal no comprobadas hacen que los resultados tengan una aplicación limitada (Owens y Zinn, 1988). El sistema francés (INRA, 1988) utiliza este método para determinar las necesidades proteicas, ya que se basa en experimentos en los que se comparan diferentes niveles de ingestión de proteína y sus balances nitrogenados. Este sistema expresa el

valor proteico de los alimentos y las necesidades del animal en términos de Proteína Verdaderamente Digestible en el Intestino delgado, abreviado como **PDI**.

Mediante el método factorial, por el contrario, se determinan las necesidades de N para funciones específicas y niveles de producción mediante la suma de las necesidades correspondientes a cada función. El NRC (2001) determina las necesidades proteicas del rumiante en lactación de forma factorial y en unidades de proteína metabolizable. La proteína metabolizable (**PM**) se puede definir como la proteína verdadera que es digerida a nivel postruminal y absorbida en el intestino (NRC, 2001) y equivaldría al concepto francés de PDI.

El Cornell Net Carbohydrate and Protein System (**CNCPS**) también expresa las necesidades proteicas en términos de proteína metabolizable. No obstante, para determinar estas necesidades utiliza una aproximación más compleja, ya que utiliza una mezcla de modelos mecanísticos y empíricos que tienen en cuenta una amplia variedad de condiciones de alimentación, manejo, constitución del animal, ambientales, etc.

Las necesidades proteicas se dividen principalmente en las de mantenimiento y las de producción, que incluyen la lactación, el crecimiento y la gestación.

2.1- Necesidades proteicas de mantenimiento

Las necesidades proteicas de mantenimiento corresponden al N endógeno urinario, al N de descamación (piel, secreciones de la piel y pelo) y al N metabólico fecal. El N endógeno urinario corresponde al N perdido en la orina de animales alimentados con dietas libres de N. Tanto el NRC (2001) como el CNCPS (Fox y col., 1992) calculan las necesidades de N endógeno urinario (**PM_u**) y de N de descamación

(**PMd**) en unidades de PM y en función del peso vivo (Tabla 1). Para calcular las necesidades de N metabólico fecal (**PMf**), el NRC (2001) lo hace en función de la materia seca ingerida y de la proteína bacteriana no digerida que aparece en las heces. El sistema asume que el 50% de la proteína bacteriana indigestible en el intestino aparece en las heces, mientras que el otro 50% es digerido en el intestino grueso. Por su lado, el CNCPS (Fox y col., 1992) asume que el N metabólico fecal corresponde al 9 % de la materia seca indigestible (Tabla 1).

Así, tanto el NRC (2001) como el CNCPS (Fox y col., 1992) predicen las necesidades de PM para el mantenimiento del animal mediante la suma de las necesidades de proteína urinaria, proteína de descamación y proteína metabólica fecal. Sin embargo, el NRC (2001) considera que las secreciones endógenas de proteína (**PMe**) también contribuyen a las necesidades de PM, asumiendo una eficiencia de utilización de la PM absorbida para proteína neta endógena de 0,67 (Tabla 1).

Por el contrario, el INRA (1988) propone un solo valor para las necesidades de mantenimiento del vacuno, que varía en función del peso vivo y que se expresa en g de PDI (Tabla 1). En este caso, las necesidades en PDI para mantenimiento fueron obtenidas mediante estudios de balance nitrogenado en animales no productivos. Así, este valor considera las pérdidas medias de N endógeno fecal asociadas a dietas normales administradas a animales no productivos.

Tabla 1. Estimación de las necesidades de proteína para el mantenimiento en los distintos sistemas de formulación de raciones para vacuno lechero.

Parámetro	Ecuación / valor	Sistema
Necesidades de proteína endógena urinaria (PMu, g/d)	$PMu^1 = 4.1 \times PV^{0.50}$	NRC (2001)
	$PMu = 0.20 \times PV^{0.6} / 0.67$	CNCPS
Necesidades de proteína de descamación (PMd, g/d)	$PMd = 0.3 \times PV^{0.60}$	NRC (2001)
	$PMd = 2.75 \times PV^{0.5} / 0.67$	CNCPS
Necesidades de proteína metabólica fecal (PMf, g/d)	$PMf^2 = [(MSI \times 30) - 0.50 ((PMb/0.80) - PMb)]$	NRC (2001)
	$PMf^3 = 0.09 \times MSI_{Ind}$	CNCPS
Necesidades de proteína endógena (PMe, g/d)	$PMe^4 = PNe / 0.67$	NRC (2001)
Necesidades totales de proteína para el mantenimiento	$PMm \text{ (g/d)} = PMu + PMd + PMf + PMe$	NRC (2001)
	$PMm \text{ (g/d)} = PMu + PMd + PMf$	CNCPS
	$3.25 \text{ g PDI/kg PV}^{0.75}$	INRA (1988)

¹ PV = peso vivo.

² MSI = materia seca ingerida; PMb = proteína metabolizable bacteriana.

³ MSI_{Ind} = materia seca indigestible.

⁴ PNe = proteína neta endógena.

2.2- Necesidades proteicas de producción

La Tabla 2 muestra las ecuaciones o los valores utilizados por los distintos sistemas de formulación para estimar las necesidades proteicas de producción. Las necesidades proteicas de producción incluyen la proteína necesaria para la gestación, el crecimiento y la lactación.

2.2.1- Necesidades proteicas para la gestación

En los últimos meses de gestación, la vaca necesita nutrientes para su mantenimiento y para el desarrollo del feto y la placenta. La estimación de las necesidades de gestación (**PMg**) por el método factorial requiere el conocimiento de las necesidades de nutrientes por parte de los tejidos fetales y de la eficiencia de utilización de los nutrientes de la ración para el desarrollo de los productos de la gestación. El NRC (2001) asume que la eficiencia de utilización de la PM para la gestación es del 33%, mientras que el CNCPS (Fox y col., 1992) asume una eficiencia del 50%. A partir de aquí, el NRC (2001) considera que las necesidades de gestación son cuantitativamente insignificantes antes del día 190 de gestación, y tras este día calcula las necesidades en función de los días de gestación, del peso al nacimiento de la cría y de la eficiencia de utilización de la PM para la gestación. El CNCPS (Fox y col., 1992) hace el cálculo en función del incremento neto de proteína de la gestación (sumatorio del incremento de proteína fetal, proteína de los cotiledones, proteína de la placenta, proteína del útero y en función del total de energía acumulada en la gestación) y del peso de la cría al nacimiento ajustado según la edad de la madre. Por otro lado, el sistema francés (INRA,

1988) considera unas necesidades para el último mes de gestación de 200 g PDI/d con una eficiencia de utilización del 60% (Tabla 2).

2.2.2- Necesidades proteicas para la lactación

El NRC (2001) y el CNCPS (Fox y col., 1992) estiman la proteína necesaria para la lactación (**PMI**) en función de la cantidad de leche producida y de su contenido en proteína. Sin embargo, mientras el NRC (2001) asume una eficiencia de utilización de la PM para la lactación del 67%, el CNCPS (Fox y col., 1992) asume un valor del 65%. El INRA (1988) considera que las necesidades proteicas para la lactación son de 48 g PDI/kg de leche estándar, con una eficiencia de utilización de la PDI del 64% (Tabla 2.).

2.2.3- Necesidades proteicas para el crecimiento

Para la estimación de las necesidades de proteína para el crecimiento (**PMc**), el NRC (2001) se basa en la ganancia de peso, el crecimiento medio diario y la energía retenida en la ganancia de peso, considerando un valor de eficiencia de utilización de la PM para el crecimiento de 28.9% (Tabla 2). El CNCPS (Fox y col., 1992) calcula estas necesidades en función de varios factores (peso adulto del animal, condición corporal, ritmo de crecimiento, etc.), para lo que utiliza diversas ecuaciones que al final permiten calcular la PMc en base a la ganancia de peso vacío y a la composición proteica de esta ganancia, con una eficiencia del 50% (Tabla 2). El valor de proteína necesaria para el crecimiento estimado por el INRA (1988) es de entre 250 y 350 g PDI/kg peso vivo, en

función del sexo, el peso y el genotipo, con una eficiencia de utilización de la PDI que oscila entre el 40 y el 68% en función de estos parámetros (Tabla 2).

Tabla 2. Estimación de las necesidades de proteína para la producción en los distintos sistemas de formulación de raciones para vacuno lechero.

Parámetro	Ecuación / valor	Sistema
Necesidades de proteína para la gestación	PMg^1 (g/d) = (((0.69 X días gest.) - 69.2) x (PNC / 45)) / EfPMg	NRC (2001)
	PMg^2 (g/d) = IP (PNCaj / 36.4) / 0.50	CNCPS
	200 g PDI/d (último mes)	INRA (1988)
Necesidades de proteína para la lactación	PMI^3 (g/d) = (Yprot / 0.67) x 1000 Donde: Yprot (kg/d)= (kg leche/d) x (proteína en leche / 100)	NRC (2001)
	PMI^4 (g/d) = 10 MM (PP) / 0.65	CNCPS
	48 g PDI/kg leche estándar	INRA (1988)
Necesidades de proteína para el crecimiento	PMc^5 (g/d) = PNc / EfPM-PNc Donde: PNc^6 (g/d) = WG x (268 - (29.4 x (RE / ADG))) EfPM-PNc = 0.28908	NRC (2001)
	PMc^7 (g/d) = EG x PB x 0.01 / 0.50	CNCPS
	250-350 g PDI/kg PV ganado	INRA (1988)

¹ PMg = proteína metabolizable para la gestación; PNC = peso de la cría al nacimiento; EfPMg = eficiencia de utilización de la proteína metabolizable para gestación.

² PMg = proteína metabolizable para la gestación; IP = incremento neto de proteína de la gestación; PNCaj = peso de la cría al nacimiento ajustado según la edad de la madre.

³ PMI = proteína metabolizable para la lactación; Yprot = cantidad de proteína segregada en leche.

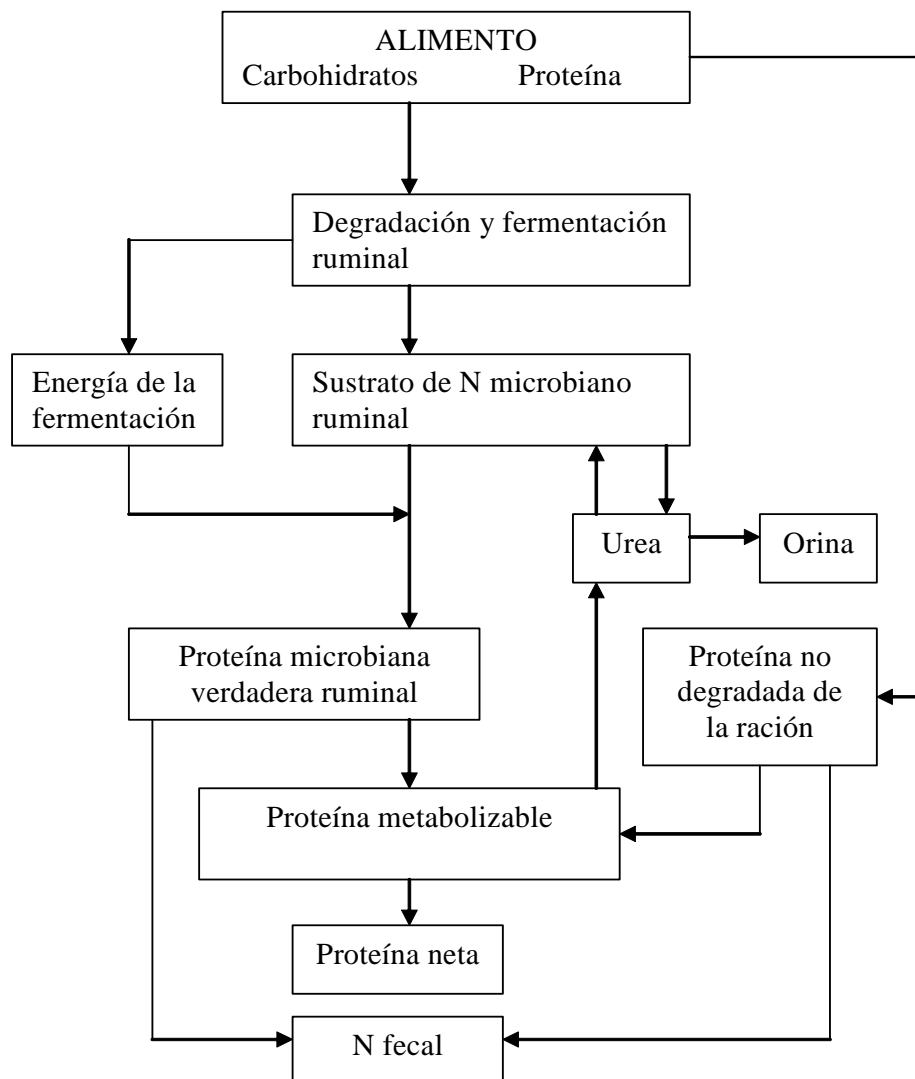
⁴ PMI = proteína metabolizable para la lactación; MM = producción de leche; PP = proteína en leche.

⁵ PMc = proteína metabolizable para el crecimiento; PNc = proteína neta para el crecimiento; EfPM-PNc = eficiencia de utilización de la proteína metabolizable para el crecimiento.

⁶ PNc = proteína neta para el crecimiento; WG = ganancia de peso; ADG = crecimiento medio diario; RE = energía retenida.

⁷ PMc = proteína metabolizable para el crecimiento; EG = ganancia de peso vacío; PB = % de proteína en la ganancia de peso.

Figura 1. Esquema general de la obtención de proteína metabolizable en rumiantes.



(Fuente: Oldham, 1996)

3- Aportes de proteína

Tradicionalmente las raciones se han formulado en base a proteína bruta (PB), que se define como el contenido en N de los alimentos x 6,25. Esta definición se basa en que se asume que el contenido medio de N de los alimentos es de 16 g por cada 100 g de proteína. Sin embargo la PB sufre numerosas transformaciones antes de ser absorbida en el intestino del rumiante como proteína metabolizable. La proteína metabolizable se define como la proteína verdadera que es digerida a nivel postruminal y cuyos aminoácidos son absorbidos en el intestino (NRC, 2001). La Fig. 1 muestra los principales procesos de digestión y metabolismo mediante los cuales los compuestos nitrogenados de la ración se convierten en proteína metabolizable. En primer lugar, la población microbiana que habita en el rumen degrada parcialmente la proteína bruta de la ración, obteniéndose así sustratos nitrogenados y una pequeña cantidad de energía procedente de la fermentación que se utilizarán para el crecimiento microbiano. Los sustratos nitrogenados se convierten en proteína microbiana en función de la disponibilidad de energía, que proviene principalmente de la fermentación de carbohidratos en el rumen. Tras su salida del rumen, la proteína microbiana contribuye al aporte de proteína metabolizable en función de la proporción de proteína verdadera que es realmente absorbida en el intestino. Otra parte de la proteína de la ración escapa a esta modificación por parte de los microorganismos del rumen y, tras los procesos de digestión y absorción, da lugar a aminoácidos que contribuyen directamente al aporte de proteína metabolizable. En definitiva, la proteína metabolizable y los aminoácidos que pasan al intestino delgado para ser digeridos son la suma de la proteína microbiana sintetizada en el rumen, la proteína de la ración que escapa de la degradación en el

rumen, y en menor proporción la proteína endógena (Cecava y col., 1990; Klusmeyer y col., 1990; Clark y col., 1992; NRC, 2001).

3.1- Aportes de proteína microbiana

La proteína microbiana es la proteína de las bacterias ruminales, los protozoos y los hongos que pasa al intestino delgado (NRC, 2001). Los microorganismos ruminales tienen la capacidad de utilizar el N amoniacal, los aminoácidos y los oligopéptidos para sintetizar proteína microbiana. Se considera que un 80% de la proteína microbiana es proteína verdadera; el otro 20% se considera que está formado por ácidos nucleicos (NRC, 1989). Del total de proteína microbiana sintetizada en el rumen y que llega al duodeno, aproximadamente el 80% es en forma de proteína bacteriana (Nolan, 1993). Los protozoos pueden llegar a constituir hasta el 40% de la biomasa microbiana del rumen (Russell y Rychlik, 2001). Sin embargo, en condiciones normales, la contribución de los protozoos a los aportes de proteína al intestino delgado es escasa, aproximadamente del 11% del total del flujo de proteína bruta (Shabi y col., 2000), ya que éstos son retenidos selectivamente en el rumen. La cantidad de proteína sintetizada por los hongos es aún menor, y existe poca información acerca de su aporte al flujo total de proteína (Orpin, 1983/84), el cual se estima inferior al 5% (Nolan, 1993).

Los carbohidratos y las proteínas son los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos y constituyen los principales factores limitantes de la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hoover y Stokes, 1991; Clark y col., 1992). La eficiencia de síntesis de proteína bacteriana se refiere a la cantidad de proteína bacteriana sintetizada por unidad de energía disponible en el rumen, y se mide en

gramos de nitrógeno bacteriano sintetizado por kg de materia orgánica verdaderamente fermentada en el rumen (g N/Kg MOVF). Stern y Hoover (1979) indicaron que la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana varía entre 10,6 y 49,0 g N bacteriano/Kg materia orgánica verdaderamente fermentada en el rumen en función de las condiciones de fermentación. Estos datos demuestran que la eficiencia de síntesis de proteína microbiana es manipulable, por lo que varios investigadores han dedicado esfuerzos al estudio de los factores que la afectan (Hobson, 1988; Clark y col., 1992; Stern y col., 1994b; Firkins, 1996). Aunque estos factores son numerosos (tipo de proteína, fuente de energía, ritmo de tránsito digestivo, frecuencia de alimentación, etc.), la disponibilidad de energía y nitrógeno son los más importantes (Hoover y Stokes, 1991). Las bacterias pueden obtener energía de las proteínas, aunque su fuente principal son los carbohidratos. Algunos carbohidratos fácilmente fermentables, como el almidón y los azúcares, son más efectivos que otras fuentes de carbohidratos, como la celulosa, a la hora de favorecer el crecimiento microbiano (Stern y Hoover, 1979). Diversos estudios *in vitro* (Demeyer y Van Nevel, 1986; Stokes y col., 1991) observaron un incremento en la síntesis de proteína microbiana al aumentar el contenido en carbohidratos no estructurales de la dieta. Hoover y Stokes (1991) determinaron que la síntesis de proteína microbiana puede aumentar un 50% (de 20 a 30 g N/Kg materia orgánica verdaderamente fermentada en el rumen) cuando se aumenta la cantidad de carbohidratos no fibrosos de la ración del 25 al 37% de la MS (Fig. 2). Russell y col. (1992) propusieron una división del ecosistema microbiano ruminal en dos grupos en función del tipo de carbohidratos que fermentan. Las bacterias que fermentan carbohidratos estructurales (celulolíticas) tienen unas necesidades energéticas de mantenimiento bajas, crecen lentamente y obtienen el N principalmente del amoníaco.

Las bacterias que fermentan carbohidratos no estructurales (amilolíticas) tienen mayores necesidades de mantenimiento, su crecimiento es rápido y utilizan amoníaco, péptidos y aminoácidos como fuentes de N.

El N utilizado por los microorganismos puede provenir de la degradación hasta amoníaco, aminoácidos y péptidos de la proteína aportada en la dieta, así como del amoníaco derivado de las fuentes de nitrógeno no proteico o de la urea reciclada a través de la pared del rumen y de la saliva. Si la cantidad o el tipo de N aportado son inadecuados el crecimiento microbiano disminuye y se reduce la actividad fermentativa (Hoover y Miller, 1992; Clark y col., 1992; Stern y col., 1994b). Hoover y Stokes (1991) demostraron que existe una relación lineal positiva entre la cantidad de proteína degradable en el rumen y la cantidad de proteína microbiana que llega al intestino (Fig. 3). Estas observaciones sugieren que cuando sustituimos proteína degradable por suplementos protegidos, disminuimos la cantidad de proteína microbiana sintetizada. Clark y col. (1992) resumieron ocho experimentos en los que se comparaban proteínas de baja degradabilidad ruminal con la harina de soja respecto al efecto que tenían sobre el paso de fracciones nitrogenadas al intestino delgado. El paso de proteína microbiana fue menor con los suplementos de baja degradabilidad y tendía a disminuir a medida que estos sustituían a la harina de soja. Por el contrario, Calsamiglia y col. (1995) no observaron diferencias en la síntesis ni en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana cuando se utilizaron 8 fuentes de proteína cuya degradabilidad ruminal varió entre el 11% y el 100%. Esto se explicaría porque en ningún caso los aportes de proteína degradable se situaron por debajo del 9% de la materia seca ingerida y, por lo tanto, no limitaron el crecimiento microbiano.

Aunque las estimaciones de la contribución del N amoniacal frente a la de los aminoácidos a la síntesis de proteína microbiana han sido muy variables (Wallace, 1997), el amoníaco se considera la principal fuente de N para la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hespell y Bryant, 1979; Wallace y Cotta, 1988; Mackie y White, 1990), especialmente para las bacterias celulolíticas (Nolan, 1993). Cuando no hay disponibilidad de péptidos y aminoácidos, todo el N debe provenir del amoníaco (Russell y col., 1992). Por ello, la concentración de N amoniacal en el rumen se utiliza como un índice que nos permite valorar la disponibilidad de N en el rumen y estimar la posibilidad de que sea un factor limitante para el crecimiento microbiano. Satter y Slyter (1974) propusieron una concentración de N amoniacal de 5mg/dL como valor umbral para maximizar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, el rango de valores óptimos encontrado en la literatura es muy variable, oscilando entre 1.7 mg/dL (Shaefen y col., 1980) y más de 23.5 mg/dL (Mehrez y col., 1977). Esta variación sugiere que en el crecimiento bacteriano influyen otros muchos factores además de la concentración de N amoniacal.

Varios investigadores han observado mejoras en el crecimiento o en la eficiencia de síntesis al sustituir el amoníaco o la urea como única fuente de N por péptidos y aminoácidos (Russell y Sniffen, 1984; Argyle y Baldwin, 1989). Los aminoácidos y péptidos libres pueden ser incorporados directamente, especialmente por las bacterias amilolíticas (Russell y col., 1992; Wallace, 1996), aunque se ha observado un mayor crecimiento de las bacterias, tanto celulolíticas como amilolíticas con el aporte de péptidos y/o aminoácidos (Argyle and Baldwin, 1989; Kernik, 1991). Al parecer, las bacterias celulolíticas disminuyen la incorporación de N amoniacal a medida que aumenta la proporción de aminoácidos en el medio (Atasoglu y col., 2001). Russell y

col. (1983) observaron en estudios *in vitro* que hasta un 66% de la proteína de los microorganismos que fermentan carbohidratos no estructurales deriva de péptidos y aminoácidos cuando estos están disponibles en el medio. El aumento de síntesis bacteriana observado al aportar péptidos y/o aminoácidos podría explicarse por una incorporación directa a la proteína microbiana y/o a la mayor disponibilidad de cadenas carbonadas (procedentes de la desaminación de aminoácidos) que pueden ser destinadas a la síntesis de nuevos aminoácidos o a la producción de energía (Bryant, 1973).

Figura 2. Efecto del nivel de carbohidratos no fibrosos (CNF) sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Hoover y Stokes, 1991)

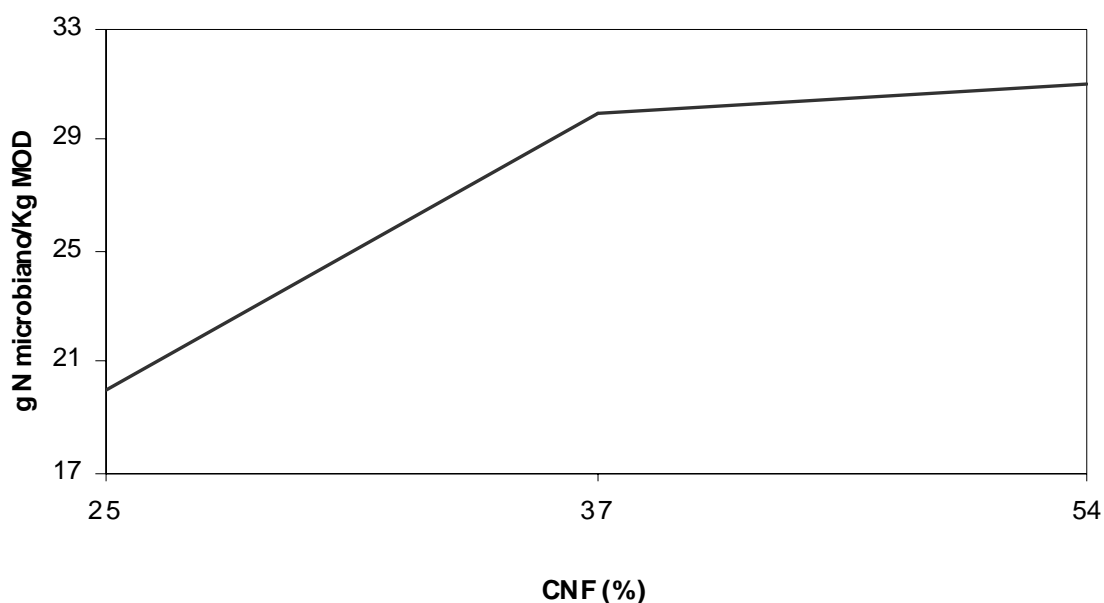
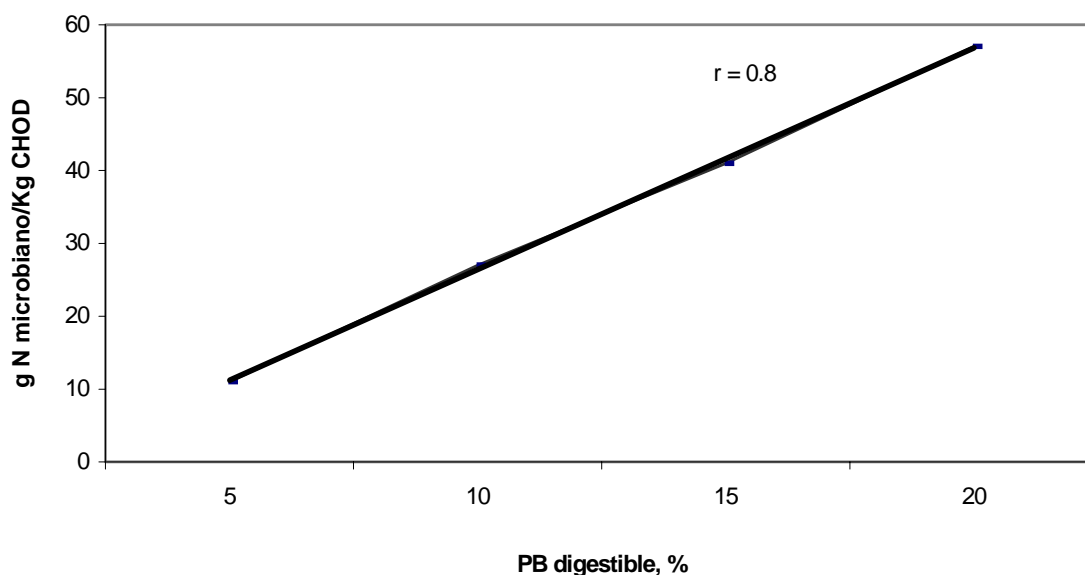


Figura 3. Efecto de la concentración de proteína degradable de la ración sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Hoover y Stokes, 1991)



Sin embargo, no sólo hay que tener en cuenta la cantidad o tipo de nutrientes que reciben los microorganismos del rumen, sino que también es muy importante considerar otros factores, como la velocidad de degradación y la coordinación de la degradación de energía y proteína, que pueden afectar a la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana (Hoover y Stokes, 1991; Russell y col., 1992). Si el ritmo de degradación de la proteína es muy superior al ritmo de fermentación de los carbohidratos, se producirá un exceso de amoníaco, mientras que si la fermentación de carbohidratos supera a la degradación de proteínas disminuirá la síntesis microbiana (Nocek y Russell, 1988). Existen numerosas revisiones bibliográficas que describen los factores que afectan a la síntesis y a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Stern y Hoover, 1979; Clark y col., 1992; Rodríguez, 2003). Estos factores, y en concreto los factores que afectan a los aportes de

aminoácidos de origen bacteriano, han sido estudiados en nuestro laboratorio por Rodríguez (2003) por lo que la presente revisión se centrará principalmente en los aspectos relacionados con los aportes de aminoácidos de origen dietario.

3.2- Aportes de proteína no degradable en el rumen

La proteína no degradable en el rumen es la porción de proteína alimentaria que escapa de la degradación ruminal y llega al intestino donde será digerida para aportar proteína absorbible al animal. Se considera que el 100% de la proteína alimentaria no degradada en el rumen es proteína verdadera (NRC, 2001).

A medida que aumenta el nivel de producción de los animales también lo hacen las necesidades de proteína, hasta el punto que la proteína microbiana es insuficiente para cubrir las necesidades de los animales de alta producción. En estas condiciones, la utilización de suplementos proteicos de baja degradabilidad ruminal es necesaria para aportar cantidades suficientes de aminoácidos al intestino delgado (NRC, 1985; Waltz y Stern, 1989). De manera ideal, las fuentes de proteína de la dieta que escapan a la degradación en el rumen deberían complementar el perfil de aminoácidos de la proteína bacteriana respecto a las necesidades del animal (Owens y Zinn, 1988). Esta es la finalidad del uso de proteínas protegidas o proteína no degradable en el rumen. Clark y col. (1992) concluyeron que los suplementos de baja degradabilidad ruminal aportados a elevadas concentraciones en la dieta incrementan el paso de N no amoniacal al intestino delgado comparado con la administración de harina de soja debido a un aumento en el paso de N no amoniacal ni microbiano. Podemos decir que la calidad de la proteína absorbible procedente de los alimentos dependerá de la cantidad de proteína no

degradable, del perfil de aminoácidos y de la digestibilidad intestinal. Todos los alimentos, excepto los suplementos de N no proteico, contienen una cantidad de proteína no degradable en el rumen, que dependerá principalmente de la solubilidad de la proteína, de su ritmo de degradación y de su constante de paso en el rumen. A diferencia de la proteína microbiana, existen grandes variaciones en la cantidad y digestibilidad intestinal de la proteína no degradable entre diferentes suplementos y también dentro de un mismo suplemento (Schwab, 1996).

La degradabilidad ruminal de las proteínas es el factor más importante que afecta a la cantidad de proteína alimentaria que llega al intestino delgado. La Tabla 3 muestra los valores de proteína no degradable de varios suplementos proteicos, estimados en la Universidad de Minnesota utilizando la técnica de bolsas in situ (Stern y col., 1994a). Es necesario llamar la atención sobre la variación que se observa en la mayoría de suplementos. Parte de esta variabilidad se atribuye a las condiciones en las que se desarrolló cada experimento. Sin embargo, una parte importante de la variabilidad puede atribuirse a diferencias reales en la calidad de los suplementos, asociadas a la naturaleza propia del ingrediente o a los procesos físicos o químicos a los que han sido sometidos. Algunos trabajos realizados con muestras de suplementos obtenidas de distintas plantas de procesado han demostrado diferencias entre suplementos y entre muestras distintas del mismo suplemento (Yoon y col., 1996; Howie y col., 1996). Estos resultados demuestran la necesidad de realizar controles de calidad en relación a la degradabilidad ruminal de la proteína de al menos algunos productos, con el objetivo de garantizar la calidad de los diferentes lotes producidos.

Tabla 3. Proteína no degradable en el rumen (PNDR) de varios suplementos proteicos. (Adaptado de Stern y col., 1994a).

Suplemento proteico	n	PNDR (% PB) Media ± DE (rango)
Harina de sangre, batch-dried	12	88 ± 6 (78-98)
Harina de sangre, ring-dried	10	83 ± 4 (76-89)
Bagazo de cerveza, secado	5	57 ± 5 (50-63)
Corn gluten meal	2	83 ± 2 (82-85)
Harina de algodón, solvent	1	46
Harina de algodón, mecánica	1	55
Granos de destilería, secados	5	56 ± 8 (47-64)
Harina de plumas, hidrolizada	12	76 ± 11 (50-88)
Harina de pescado, menhaden	13	65 ± 4 (59-73)
Harina de carne y hueso	11	59 ± 13 (40-88)
Harina de soja	5	25 ± 3 (22-29)
Harina de soja, lignosulfonato	6	66 ± 8 (57-77)
Harina de soja, expeller	3	46 ± 8 (38-53)

3.3- Aportes de proteína endógena

El NRC (1989) consideraba que la proteína que llega al intestino tenía su origen únicamente en la proteína bacteriana y en la proteína no degradable en el rumen. No obstante, el nuevo NRC (2001) considera que el N endógeno también contribuye al paso de N al duodeno. El N endógeno representa: (1) las mucoproteínas de la saliva, (2) las células epiteliales del tracto respiratorio superior, (3) los restos de células resultantes de la abrasión del tejido epitelial de la boca, esófago y retículo-rumen, (4) los restos celulares de la descamación del tejido epitelial del omaso y abomaso, y (5) las secreciones enzimáticas del abomaso. Es probable que las tres primeras fuentes de proteína endógena sean degradadas en el rumen, por lo que no contribuirían en su totalidad al aporte de proteína en el intestino. Aun así, las cantidades de N endógeno que pasan al intestino delgado siguen siendo aparentemente significativas. Brandt y col. (1980) concluyeron que, con dietas normales, el paso de N endógeno constituye del 9 al 12% del total del N no amoniacal que pasa al intestino. Sin embargo, la estimación de los aportes de proteína endógena se ve complicada por la dificultad de distinguir entre N endógeno y N microbiano o N dietario en la digesta duodenal, por lo que existen pocas aportaciones al respecto. En general, parece ser que la cantidad de N endógeno que pasa al duodeno está estrechamente correlacionada con la cantidad de materia orgánica indigestible o, por aproximación, con la cantidad de materia seca ingerida. Vérité y Peyraud (1989) crearon una ecuación de regresión a partir de 405 observaciones en ovejas, terneras y vacas, para determinar la contribución del N microbiano, N dietario y N endógeno al paso al intestino de N no amoniacal. Según esta ecuación el flujo de N endógeno al intestino es de 5.3 g/kg de materia orgánica no digestible, o

aproximadamente 1.7 g/kg de materia seca ingerida. La ecuación utilizada por el NRC (2001) para predecir el paso de proteína endógena se basa en la materia seca ingerida (IMS) y es: N endógeno (g/día) = 1,9 x IMS (kg/día). Los datos de contenido y digestibilidad de la proteína verdadera del N endógeno son limitados, pero el NRC (2001) considera que un 50% de la proteína endógena que llega al duodeno es proteína verdadera con una digestibilidad del 80%.

4- Degradación de proteínas en el rumen

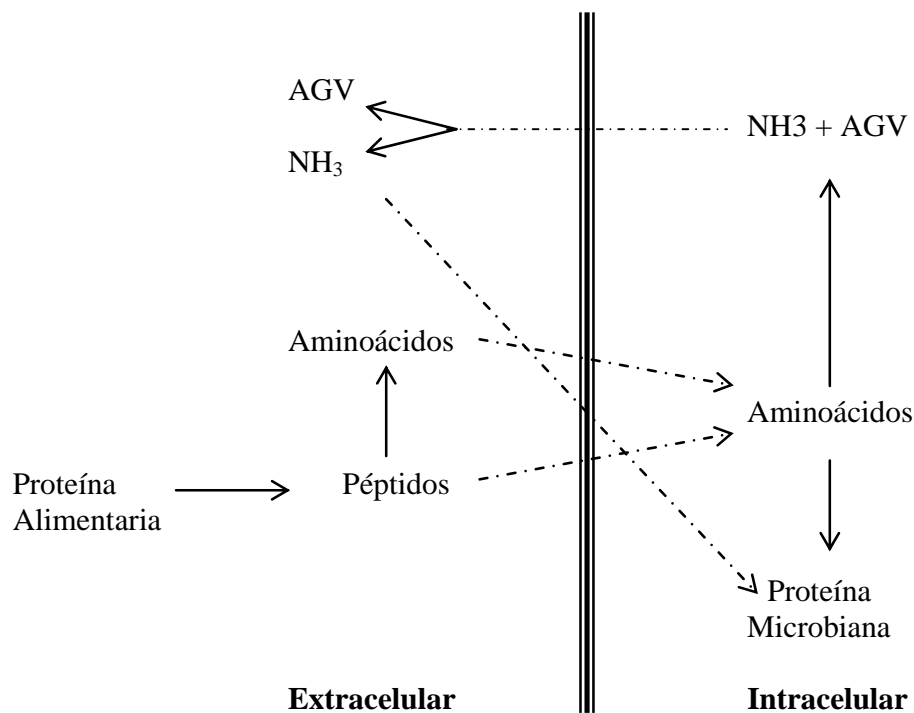
4.1- Mecanismo de degradación de proteínas en el rumen

La proteína ingerida por el rumiante es sometida a una extensiva degradación por parte de los microorganismos que habitan en el rumen. Varias especies de bacterias, protozoos y hongos anaerobios participan en esta actividad proteolítica mediante la elaboración de diversas proteasas, peptidasas y desaminasas (Wallace, 1996).

Las bacterias son los principales microorganismos implicados en la degradación de la proteína. Más del 40 % de las especies aisladas muestran actividad proteolítica (Broderick y col., 1991; Wallace, 1996; NRC, 2001). La mayoría de proteasas bacterianas están asociadas a la pared bacteriana (Kopecny y Wallace, 1982), de manera que el primer paso para la degradación de la proteína es la adhesión de las bacterias a las partículas de alimento (Brock y col., 1982; Wallace, 1985). La Figura 4 muestra esta degradación anaeróbica que tiene lugar en el rumen. Consiste inicialmente en una hidrólisis de los enlaces peptídicos mediante proteasas y peptidasas (Van Straalen y Tamminga, 1990), de la que se obtienen oligopéptidos que posteriormente se degradan a péptidos de menor tamaño y a algunos aminoácidos libres que serán transportados al

interior de la célula (NRC, 2001). Estos pueden ser utilizados directamente por los microorganismos ruminales o ser desaminados para producir amoníaco y cadenas carbonadas (Bach y col., 2005). A su vez, las cadenas carbonadas pueden ser utilizadas junto con el amoníaco para sintetizar nuevos aminoácidos que serán incorporados a la proteína microbiana, o bien ser descarboxiladas dando lugar a ácidos grasos volátiles y dióxido de carbono. La desaminación de los aminoácidos ramificados proporciona ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR), necesarios para el desarrollo de algunos microorganismos ruminales, especialmente para las bacterias celulolíticas (Hobson, 1988). En los últimos años, se ha mostrado un especial interés en el estudio de las bacterias responsables de la desaminación, ya que al ser productoras de amoníaco juegan un papel muy importante en la eficiencia de retención de nitrógeno por parte del animal. Durante mucho tiempo, se ha asumido que especies bacterianas como *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminatum* o *Butyrivibrio fibrisolvens*, con una baja actividad desaminadora pero presentes en el rumen en elevadas cantidades, eran las principales responsables de la desaminación de AA. Sin embargo, Russell y col. (1988) aislaron un grupo de bacterias mucho menos numerosas que las anteriores pero con una actividad productora de amoníaco mucho mayor. Estas bacterias, pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Peptostreptococcus* y conocidas como bacterias hiperproductoras de amoníaco (HAP), no fermentan carbohidratos, sino que utilizan los AA como la principal fuente de energía y nitrógeno. Como consecuencia, es muy importante controlar la proliferación de este tipo de bacterias ya que, aunque su presencia en el rumen es minoritaria, el impacto que pueden tener sobre la eficiencia de retención de N por parte del animal es muy destacable (Wallace, 1996).

Figura 4. Esquema de la degradación de la proteína en el rumen (Adaptado de Russell y col., 1991).



A diferencia de las bacterias, los protozoos son capaces de ingerir pequeñas partículas (bacterias, hongos y pequeñas partículas de alimento), y la proteólisis tiene lugar en el interior de la célula (Tamminga, 1979; NRC, 2001). La mayor actividad proteolítica la ejercen sobre las bacterias ruminales, y son los principales responsables del reciclaje de proteína bacteriana en el rumen, observándose un descenso en la tasa de renovación de proteína bacteriana en animales defaunados (Wallace y McPherson, 1987). Si bien las bacterias aportan gran parte de la proteína ingerida en forma de partículas, también las proteínas de la dieta son fagocitadas activamente por los protozoos (Hoover y Miller, 1992; Van Soest, 1994). Esta forma de alimentación explica por qué los protozoos incrementan la degradabilidad de las proteínas poco solubles de la

ración (Jouany, 1996). Por esta razón, la presencia de protozoos tiene un efecto negativo sobre la disponibilidad de proteínas en situaciones en que la ración es rica en proteína de baja degradabilidad (Hoover y Miller, 1992).

La participación de los hongos anaerobios en la degradación de la proteína en el rumen consiste principalmente en colonizar y degradar los tejidos lignificados de las plantas, favoreciendo así el acceso de las enzimas bacterianas (Fonty y Joblin, 1991). Sin embargo, estudios *in vitro* (Wallace y Joblin, 1985; Wallace y Munro, 1986) muestran una actividad proteasa elevada en algunas cepas como el *Neocallimastix frontalis*.

4.2- Factores que afectan a la degradación de la proteína de la ración

Aunque existen diversos factores que afectan a la cantidad de proteína bruta de la ración que se degradada en el rumen, la cantidad de proteína degradada depende principalmente de la solubilidad y de la relación entre el ritmo o velocidad de degradación del substrato y el tiempo de permanencia de éste en el rumen (Tamminga, 1979; Chalupa, 1984). La degradación ruminal de la proteína ha sido descrita por varios modelos que consideran que la fracción de proteína bruta de los ingredientes está compuesta a la vez por múltiples fracciones que difieren en su ritmo de degradación. En todos los casos, la desaparición de la proteína en el rumen es el resultado de la acción simultánea de la degradación y del ritmo de paso. El modelo del Net Carbohydrate and Protein System (Sniffen y col., 1992) es de los más complejos, ya que divide la proteína bruta en 5 fracciones (A, B₁, B₂, B₃ y C). Sin embargo, el modelo más utilizado que

describe la degradación in situ de las proteínas es el que divide la proteína bruta de los ingredientes en tres fracciones: A, B y C (Ørskov y McDonald, 1979).

1) La fracción A corresponde al porcentaje del total de proteína bruta que es N no proteico (asumiendo que se degrada instantáneamente) y a una pequeña cantidad de proteína verdadera que escapa de la bolsa *in situ* debido a su gran solubilidad o a su pequeño tamaño.

2) La fracción C es el porcentaje de proteína bruta que es totalmente indegradable.

3) El resto de la proteína será la fracción B, e incluye a las proteínas potencialmente degradables. La fracción B es la única afectada por el ritmo de paso, asumiendo que toda la fracción A es degradada, y que toda la fracción C pasa al intestino. La cantidad de proteína degradable en el rumen (**PDR**) y proteína no degradable en el rumen (**PNDR**) para un determinado alimento según este modelo se calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{PDR} = A + B[\text{Kd}/(\text{Kd} + \text{Kp})]$$

$$\text{PNDR} = B[\text{Kp}/(\text{Kd} + \text{Kp})] + C$$

Donde:

PDR = Proteína degradable en el rumen del ingrediente, % PB

A = Fracción soluble, % PB

B = Fracción potencialmente degradable, % PB

C = Fracción indegradable, %PB

Kd = ritmo de degradación de la fracción B, %/h

K_p = ritmo de paso, %/h

La suma de PDR y PNDR es igual al 100%.

4.2.1- Factores que afectan al ritmo de degradación

La velocidad con que se degradan las proteínas en el rumen depende principalmente de las características intrínsecas de la proteína, como su solubilidad o estructura, de los tratamientos a los que haya sido sometida y de la actividad de las bacterias ruminales.

4.2.1.1- Características de la proteína

Durante mucho tiempo se ha asumido que la degradación de la proteína está condicionada por su solubilidad en el líquido ruminal, ya que los compuestos solubles se degradan más rápidamente debido a una mayor facilidad de acceso por parte de los microorganismos ruminales (Owens y Zinn, 1988; NRC, 1985). Por ejemplo, las glutelinas y prolaminas son insolubles y se degradan lentamente, mientras que las globulinas son solubles y muy degradables en el rumen (Romagnolo y col., 1994). Sin embargo, no existe una relación universal directa y simple entre la solubilidad de la proteína y su degradabilidad ruminal, ya que algunas proteínas muy solubles son poco degradables, como la albúmina (Mahadevan y col., 1980). Stern y Satter (1984) compararon datos de degradabilidad ruminal obtenidos con la técnica *in situ* con la solubilidad de la proteína. En general, la correlación entre la solubilidad de la proteína y

las estimaciones de degradabilidad fue baja, indicando que la solubilidad de la proteína no es un buen predictor de la degradabilidad ruminal. Aun así, sugirieron que la solubilidad puede ser utilizada para comparar la degradabilidad ruminal de muestras de un mismo suplemento, pero no entre distintos suplementos.

Parece ser que a parte de la solubilidad existen otras características de la proteína que juegan un papel importante en su degradación ruminal. Las características principales de la proteína de la ración a tener en cuenta en relación a su degradabilidad ruminal son: las proporciones de NNP y proteína verdadera, y las características físicas y químicas de esta fracción de proteína verdadera (NRC, 2001). Los compuestos de NNP se degradan tan rápidamente en el rumen (>300%/h) que se asume que su degradación es del 100 % (Sniffen y col., 1992). A diferencia del NNP, la degradación de las proteínas verdaderas es muy variable. Algunas de las características de las proteínas más determinantes de su degradación ruminal son (NRC, 2001; Bach y col., 2005):

- a- Su estructura tridimensional.
- b- Presencia de uniones intra e intermoleculares que dificultan el acceso de los enzimas proteolíticos.
- c- Presencia de barreras físicas como las paredes celulares que impiden el acceso de las bacterias.
- d- Presencia de factores antinutricionales que reducen o inhiben la proteólisis.

4.2.1.2- Tratamiento del alimento

Aunque algunas proteínas tienen baja degradabilidad ruminal de manera natural, otras proteínas tienen baja degradabilidad debido a los efectos del procesado. Las proteínas protegidas son suplementos ricos en proteína que han sido procesados o tratados con la finalidad de disminuir la degradabilidad ruminal de la proteína y aumentar el contenido en proteína no degradable en el rumen pero digestible en el intestino (NRC, 2001). Se han desarrollado numerosos tratamientos físicos y químicos con el objetivo de disminuir la degradación de las proteínas en el rumen y mejorar así el flujo total de N y el perfil de aminoácidos que llegan al duodeno (Windschitl y Stern, 1988). La mayoría de métodos se basan en la aplicación de calor, agentes químicos o una combinación de ambos que alteran las características de la proteína y e incrementan su resistencia a las enzimas proteolíticas (Broderick y col., 1991), como ya se ha comentado en el apartado anterior. Una proporción variable de las uniones formadas a causa de estos tratamientos se rompen bajo las condiciones ácidas del abomaso (Owens y Bergen, 1983), de manera que los aminoácidos quedan disponibles para su digestión y absorción en el intestino.

a- Tratamientos térmicos

El tratamiento térmico disminuye la degradabilidad de la proteína en el rumen mediante la desnaturalización de la proteína y la formación de diversos complejos de Maillard y enlaces peptídicos, lo que impide la acción de los enzimas proteolíticos (Broderick y col., 1991; NRC, 2001). Se han desarrollado numerosos métodos de aplicación de calor, como la extrusión (Stern y col., 1985), el proceso expeller

(Broderick, 1986), y el jet-sploding (Deacon y col., 1988). A medida que aumenta la aplicación de calor aumenta la cantidad de proteína no degradable en el rumen, pero también aumenta la cantidad de proteína no digestible en el intestino, ya que un exceso de calor conduce a la formación de enlaces irreversibles (Van Soest, 1994). Inicialmente, la cantidad de proteína no digestible obtenida es inferior a la cantidad de proteína protegida ante la degradación ruminal, de manera que para obtener la máxima cantidad de proteína disponible para ser digerida en el intestino se requiere que el tratamiento térmico no sea muy intenso (Satter, 1986). Calsamiglia y Stern (1995) demostraron que un exceso de calor disminuía la digestibilidad intestinal de las harinas de soja. Además, el sobrecalentamiento también causa pérdidas significativas de determinados aminoácidos como lisina, cistina y arginina debido a la formación de enlaces cruzados (Ashes y col., 1984; Dale, 1996).

En consecuencia, la eficacia del tratamiento térmico dependerá del tiempo y temperatura óptima que disminuya la degradabilidad ruminal de la proteína sin afectar significativamente a su digestibilidad intestinal ni producir pérdidas importantes de aminoácidos (Broderick y col., 1991; NRC, 2001). Las condiciones de tiempo y temperatura que proporcionarán una protección óptima es variable en función del suplemento. Así, según Satter (1986), si sometemos a la semilla entera de algodón a un tratamiento térmico de 160°C durante 20 minutos, se consigue un nivel de protección similar al obtenido si realizamos un tratamiento a 140°C durante 60 minutos.

b- Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos pueden ser de tres tipos:

1) sustancias como los aldehídos que reaccionan con la proteína formando complejos resistentes a la degradación ruminal (Rooke y col., 1982; Waltz y Stern, 1989).

2) agentes químicos (ácidos, álcalis y etanol) que actúan desnaturalizando la proteína (Waltz y Loerch, 1986; Lynch y col., 1987; Waltz y Stern, 1989).

3) sustancias como los taninos que se unen a las proteínas protegiéndolas de la degradación en el rumen (Ørskov, 1988).

Waltz y Stern (1989) evaluaron en un sistema de cultivo continuo varios métodos de protección de la harina de soja (extracción con disolventes = control, hidróxido sódico, etanol, formaldehído, proceso expeller, tratamiento con ácido propiónico, lignosulfonato y extrusión). En este experimento, 5 de los 7 tratamientos (formaldehído, proceso expeller, lignosulfonato, propionato y extrusión) redujeron la degradación de la proteína por las bacterias ruminales, siendo el tratamiento con formaldehído el más efectivo, seguido del proceso expeller y el tratamiento con lignosulfonato. Los tratamientos que menos impidieron la degradación microbiana fueron el tratamiento con propionato y la extrusión.

c- Tratamientos combinados

La combinación de tratamientos puede resultar un método muy efectivo de protección de suplementos proteicos. Así, Windschitl y Stern (1988) concluyeron que la aplicación de tratamiento térmico a la torta de soja en presencia de lignosulfonato

cálcico redujo la degradación ruminal de la proteína sin restringir severamente su disponibilidad intestinal. En general, el término lignosulfonato se usa para describir los productos derivados de la digestión ácida de la madera que contienen ácido lignosulfónico o sus sales, así como hemicelulosa y varios azúcares (Windschitl y Stern, 1988). La combinación de ambos tratamientos da lugar a reacciones de Maillard al reaccionar los azúcares reductores con los grupos amino libres de las proteínas (Broderick y col., 1991; NRC, 2001). Cleale y col. (1987 a, b, c), obtuvieron una protección óptima con una combinación de tratamiento térmico (105°C durante 30 min.) de la harina de soja en presencia de azúcares reductores (xilosa).

La encapsulación física de un suplemento proteico es otro posible método de protección. Así, Ørskov (1988) propuso encapsular suplementos proteicos degradables mediante la pulverización con sangre y su posterior secado por calor, obteniendo una capa de harina de sangre que por su baja degradabilidad impide el ataque de las bacterias. Lynch y col. (1987) utilizaron aceite de semilla de algodón para encapsular harina de soja, y observaron un descenso de la degradación de la proteína in situ. Así, la idea de la encapsulación también puede aplicarse en combinación con métodos químicos, de manera que la protección química se aplique sólo a la cápsula (Broderick y col., 1991).

4.2.1.3- Actividad de las bacterias ruminales

En principio, cualquier factor que altere las condiciones necesarias en el rumen para una fermentación ruminal óptima puede afectar a la actividad degradativa de las bacterias, debido a un efecto sobre el hábitat microbiano.

Teniendo en cuenta que el pH óptimo para la mayoría de enzimas proteolíticos del rumen está aproximadamente entre 5,5 y 7,0 (Kopecny y Wallace, 1982; Wallace y Cotta, 1988), la intensidad de degradación de la proteína desciende cuando disminuye el pH debido a cambios en las poblaciones bacterianas. Cardozo y col. (2000, 2002) realizaron dos estudios en cultivos continuos de flujo doble comparando raciones ricas en forraje y raciones ricas en concentrado a unos pH que oscilaban entre 4.9 y 7.0, y obtuvieron una disminución en la degradación de la proteína al disminuir el pH en ambos tipos de raciones. En estos mismos trabajos, se observó una disminución de la degradación de la proteína al utilizar raciones ricas en concentrado como sustrato para los microorganismos, independientemente del pH. Estos resultados indican que tanto el pH como el tipo de sustrato pueden modificar el tipo de población bacteriana predominantes en el rumen y afectar a la degradación de proteína. Además de producir variaciones en la población microbiana, la modificación del pH puede producir cambios en la propia proteína y por lo tanto en su degradabilidad (Owens y Zinn, 1988).

También se ha observado que bajas concentraciones de amoníaco en el rumen pueden disminuir la velocidad de degradación ruminal, probablemente debido al descenso en la cantidad o actividad de bacterias en un medio en el que el nitrógeno es el factor limitante (Ørskov, 1988). En consecuencia, hay que tener en cuenta la necesidad

de aportar niveles mínimos de amoníaco para no restringir la actividad microbiana cuando se utilizan proteínas protegidas (Owens y Bergen, 1983). En estos casos, puede ser necesaria la incorporación a la dieta de N no proteico adicional para cubrir las necesidades de amoníaco de los microorganismos del rumen (Owens y Zinn, 1988).

En este apartado también cabe mencionar el uso de aditivos destinados al control de la actividad microbiana ruminal sobre la degradación proteica. La inhibición de la proteólisis y en especial de la desaminación ha sido durante años un objetivo importante en la manipulación de la fermentación ruminal. Uno de los aditivos más utilizados en los últimos años ha sido el antibiótico monensina, que al parecer actúa principalmente sobre el catabolismo de péptidos y aminoácidos (Whetstone y col., 1981; Chen y Russell, 1991). Como efectos más destacados de la monensina se consideran la inhibición de las principales bacterias desaminadoras Gram positivas (conocidas como bacterias hiperproductoras de amoníaco o bacterias HAP) (Russell, 1987), y la supresión de *Streptococcus bovis*, una bacteria proteolítica muy activa en el rumen (Bergen y Bates, 1984). Sin embargo, la preocupación por el uso de antibióticos en los piensos y la aparición de resistencias cruzadas con los antibióticos usados en medicina humana, han propiciado la prohibición total de estos antibióticos en la Unión Europea (Reglamento 1831/2003/CE). Esta prohibición ha fomentado la búsqueda de alternativas más seguras, como los extractos de plantas, aunque todavía existe en general, un gran desconocimiento de su acción como aditivos alimentarios en rumiantes. Uno de los extractos más estudiados ha sido el extracto de *Yucca schidigera*, que se caracteriza por ser rico en saponinas. Aunque el principal efecto de las saponinas como moduladoras de la fermentación ruminal parece ser la supresión de protozoos, también se han observado algunos efectos sobre las bacterias ruminales (Wallace y col., 1994), principalmente

sobre las bacterias Gram positivas, de forma parecida a los antibióticos ionóforos. Otros extractos de plantas, y en particular aceites esenciales, también han demostrado ser efectivos en la reducción de la peptidólisis y de la desaminación (Cardozo y col., 2004; Busquet y col., 2005).

4.2.2- Factores que afectan al tiempo de retención

El nivel de degradación de la proteína también puede estar influenciado por el ritmo de paso (Ørskov, 1988), ya que este determina el tiempo de permanencia de las proteínas en el rumen y por lo tanto el tiempo que estas permanecerán expuestas a la actividad proteolítica. De esta manera, la degradación de la proteína es inversamente proporcional al ritmo de paso (Ørskov y McDonald, 1979). El ritmo de paso se expresa como la porción de contenido ruminal que abandona el rumen por hora (Hoover y Miller, 1992). Según Ørskov (1988) la velocidad de paso de los suplementos proteicos oscila entre 0,01/h y 0,1/h y la degradabilidad disminuye en proporciones variables con el ritmo de paso, notándose más este efecto en las proteínas con velocidades de degradación intermedia. Como ejemplo, la degradabilidad de la harina de linaza disminuye del 86,8 al 39,6% al aumentar el ritmo de paso de 0,01 a 0,1/h (Ørskov, 1988). En la Tabla 4, se muestra cómo algunos suplementos pueden tener una degradabilidad similar para un determinado ritmo de paso, siendo marcadamente diferentes para otro (harina de linaza, y harina de carne y hueso a un ritmo de 0,08 o a un ritmo de 0,02).

Tabla 4. Degradabilidad de varios suplementos proteicos para diferentes ritmos de flujo obtenida en animales alimentados con raciones a base de forrajes. (Modificado de Ørskov, 1988).

Tipo de proteína	Degradabilidad (%) para el ritmo de flujo (k)		
	0.02	0.05	0.08
H. de pescado (origen desconocido)	64.3	49.6	41.5
H. de carne y hueso	52.1	45.4	41.2
H. de semilla de algodón	80.6	69.6	62.7
H. de linaza	78.1	58.9	46.0
H. de soja	80.8	62.5	50.4
H. de cacahuete	87.4	74.1	64.3
H. de girasol	85.9	76.9	70.4

El ritmo de paso, el inverso del tiempo de retención, varía en función de numerosos factores (Chalupa, 1984), entre los que destacaremos el nivel de ingestión, la frecuencia de alimentación, el tamaño de la partícula y la relación forraje/concentrado. El NRC (2001) incorpora ecuaciones de predicción del ritmo de paso para forrajes secos y húmedos y para concentrados, basándose en la ingestión de materia seca, el contenido en fibra y el porcentaje de concentrado de la dieta. Otros factores como el tamaño de partícula o la frecuencia de alimentación no se consideran en estas ecuaciones debido a que no existen suficientes datos como para incluir estos parámetros.

4.4.2.1- Nivel de ingestión

El rumen es un sistema de fermentación continua en el que entran alimentos, tampones (saliva y otras sales) y fluidos (agua y saliva) de forma semicontinua o intermitente. La salida de los residuos no digeridos será proporcional a la entrada, de

manera que a medida que aumenta la ingestión aumentará el ritmo de paso (Hoover y Miller, 1992). No obstante, el efecto de la ingestión de alimento sobre el tiempo de retención en el rumen y sobre la degradación de la proteína probablemente es menor al aumentar la ingestión de materia seca de un plano medio a un plano superior de ingestión comparado con el aumento de ingestión baja a media (Clark y col., 1987).

En un experimento realizado con vacas lecheras con cánulas reentrantes en el intestino delgado y alimentadas con una mezcla de forraje y concentrado, se comprobó que el flujo de N alimentario no degradado al intestino, pasó del 26% al 42% al aumentar el plano de alimentación de 2 a 3,3 veces la ingestión de mantenimiento (Tamminga, 1979). Esto se podría atribuir al incremento en el ritmo de paso de sólidos y líquidos desde el rumen, que suele ir asociado al incremento de la ingestión (McCarthy y col., 1989).

4.2.2.2- Frecuencia de distribución del alimento

En un estudio llevado a cabo por Soto-Navarro y col. (2000) en el que se evaluó el efecto de la frecuencia de alimentación y fluctuación de la ingestión sobre la fermentación ruminal, los resultados indicaron que ninguno de estos dos factores afectó al volumen de líquido ruminal ni al ritmo de paso de fluídos o partículas. Otros autores (Elimam y Ørskov, 1985) tampoco encontraron diferencias significativas en el ritmo fraccional de paso al variar la frecuencia de administración de la dieta completa, o sólo del concentrado, entre una y doce veces diarias.

4.2.2.3- Tamaño de partícula

La reducción en el tamaño de partícula del alimento provoca, en general, un descenso en el tiempo de retención en el rumen.

Tradicionalmente se ha afirmado que el ritmo de paso estaba influenciado por un tamaño de partícula crítico, de manera que una reducción en el tamaño de partícula del alimento aumentaría la probabilidad de escape del rumen. Sin embargo, la reducción del tamaño de partícula de la ración base a 40 o 20 mm no tuvo un efecto significativo sobre el ritmo de paso de la harina de pescado en el rumen de vacas en lactación, aunque una molienda más fina (5mm) acompañada de la formación de pellets, sí provocó una reducción significativa en el ritmo de paso de este suplemento (Elimam y Ørskov, 1984). No obstante, algunos autores defienden que el efecto del tamaño de partícula sobre el ritmo de paso no sería directo, sino que estaría mediado por otros factores como: la retención de las partículas en un entramado de fibra, los cambios en el peso específico, la capacidad de hidratación de las partículas, la motilidad del retículo-rumen y cantidad de digesta expulsada en cada contracción (Firkins y col., 1998; Luginbuhl y col., 1990).

Murphy y col. (1989) administraron partículas de plástico de diferentes tamaños a búfalos y vacas, y observaron un incremento en el ritmo de paso de entre el 55 y el 145% cuando las partículas de 5mm eran rumiadas, siendo este incremento atribuible a la reducción del tamaño de la partícula. En el trabajo de Luginbuhl y col. (1990) los resultados indican que más de la mitad de la digesta presente en el retículo-rumen tenía un tamaño de partícula inferior al considerado crítico para el paso, indicando que la

reducción del tamaño de partícula, aunque un prerequisite, no es el factor limitante para regular la salida de la digesta del retículo rumen.

En cuanto al efecto de las partículas de mayor tamaño sobre el tiempo medio de retención de la MS en el rumen, Shaver y col. (1988) indicaron que el mayor tiempo de retención se debía a la formación de entramados en el rumen que atraparían a las partículas pequeñas, y no a un mayor tiempo de retención de las partículas grandes por sí mismas.

4.2.2.4- Relación forraje/concentrado

El ritmo fraccional de paso de la harina de pescado disminuyó significativamente (de 0.086/h a 0.064/h) al pasar de una relación 50:50 forraje:concentrado a una relación 25:75 forraje:concentrado (Elimam y Ørskov, 1984). Colucci y col. (1990) estudiaron el efecto del nivel de ingestión y de la relación forraje/concentrado sobre el ritmo fraccional de paso de la alfalfa y la harina de soja. El ritmo de paso de ambos ingredientes se correlacionó de forma lineal y negativa con la proporción de concentrado en la dieta cuando el nivel de ingestión era bajo. Para niveles de ingestión altos, el efecto se mantiene para el concentrado, mientras que el ritmo de paso del forraje sólo se reduce con proporciones elevadas de concentrado.

El efecto de la relación forraje/concentrado sobre el ritmo fraccional de paso del rumen, queda confundido por diversos factores que complican su interpretación. Las características físicas (tamaño y distribución de las partículas, densidad) y químicas (contenido y composición de la pared celular) del forraje parecen afectar en gran medida

a su degradabilidad. La cantidad de alimento consumido es, probablemente, la variable más importante asociada con el tiempo de retención en el rumen (Colucci y col., 1990).

5- Digestión intestinal de la proteína no degradada en el rumen

La digestión de la proteína que abandona el rumen se inicia en el abomaso con la digestión ácido péptica. Como resultado de esta acción se liberan péptidos que pasan al intestino delgado, donde son hidrolizados por los diferentes enzimas pancreáticos e intestinales hasta pequeños péptidos y aminoácidos que son absorbidos por los enterocitos. Existen varios métodos para determinar la digestibilidad intestinal de las proteínas. El método *in vivo*, aunque es el que se utiliza para la evaluación de otros métodos, resulta muy caro y complicado, ya que requiere el uso de animales canulados. Este método establece la digestión intestinal de la proteína calculando la desaparición de proteína entre el duodeno y el íleon, y conlleva varios factores de error como pueden ser las variaciones inherentes al animal y errores asociados a la localización de la cánula y al uso de marcadores de flujo. Como consecuencia, se han desarrollado métodos alternativos entre los que se incluyen los bioensayos con animales no rumiantes, la técnica *in situ* de las bolsas móviles y varios métodos *in vitro* (Stern y col., 1997). El método más utilizado para la estimación de la digestibilidad intestinal de proteína es el de las bolsas móviles (Hvelplund, 1985). Según este método, se introducen pequeñas cantidades de alimento, o de lo que queda sin degradar tras su paso por el rumen, en bolsas de nylon. Estas bolsas se preincuban en una solución de HCl con pepsina, o se introducen directamente en el duodeno para ser recuperadas después en el íleon o, más comúnmente, en las heces. Las bolsas recuperadas se someten a lavados para eliminar

los posibles contaminantes, y se analiza su contenido en N o aminoácidos. Sólo en el trabajo de Hvelplund (1985), e incluyendo únicamente siete alimentos en la regresión, los valores de digestión intestinal de proteína estimados mediante esta técnica con recuperación de muestras en las heces han sido correlacionados con valores obtenidos *in vivo*, obteniéndose un coeficiente de determinación de $r = 0.81$. Esta técnica es más fácil y rápida que el método *in vivo* y resulta útil a la hora de predecir la digestión intestinal de proteínas. Sin embargo existen algunos factores de variación como la contaminación de los residuos, la porosidad de la bolsa, el tiempo de retención o el lugar de recuperación de las bolsas, que pueden alterar la precisión de los resultados (Stern y col., 1997). Hvelplund (1985) indicó que el 50 % de la proteína de soja no degradada en el intestino delgado desaparecía de la bolsa en el intestino grueso, originando una sobreestimación de su digestibilidad. Igualmente, detectó una interacción entre el tipo de alimento (harina de soja o harina de colza) y el lugar de recogida de las bolsas de nylon (íleal vs fecal) que podrían cuestionar la precisión de esta técnica. En consecuencia, es necesario estandarizar y validar el proceso con tal de obtener resultados fiables y comparables entre distintos laboratorios (Stern y col., 1997).

Más recientemente Calsamiglia y Stern (1995) desarrollaron una técnica *in situ-in vitro* para la estimación de la digestión intestinal de proteínas en rumiantes. Esta técnica simula las condiciones fisiológicas del rumiante y consiste en: 1) preincubar muestras de alimentos en el rumen mediante bolsas de nylon, 2) incubar durante 1 h los residuos no degradados en el rumen en una solución de HCl 0.1 N a la que se añade 1 g/l de pepsina, 3) neutralizar la mezcla con NaOH 1 N y un tampón fosfato con pancreatina, e incubar durante 24 h, y 4) precipitar las proteínas no digeridas con una solución de ácido tricloroacético. La ecuación de regresión entre las estimaciones obtenidas

mediante esta técnica y valores obtenidos *in vivo* muestra una elevada correlación ($r = 0.91$), demostrando la fiabilidad de la técnica. Además de fiable, esta técnica resulta más rápida y económica que las técnicas *in vivo* o *in situ*, presentándose como una buena alternativa al uso de animales canulados en el intestino.

El desarrollo de métodos rápidos y fiables ha evidenciado la existencia de una variación importante en la digestión intestinal de la proteína, no sólo entre suplementos proteicos, sino entre muestras distintas del mismo suplemento, encontrándose valores de digestibilidad que suelen oscilar entre el 50 y el 100 % (Tabla 5).

Tabla 5. Digestión intestinal (DI) de la proteína no degradable en el rumen (PND) de diferentes alimentos. (Adaptado de Stern y col., 1997).

Alimento	n	DI (% PND)	DE	Rango
Proteínas vegetales				
Algodón, harina, solvente	1	71		
Algodón, harina, mecánica	1	80		
Soja, harina	5	90	4	86-93
Soja, harina, expeller	6	93	7	83-100
Soja, harina, lignosulfonato	6	88	4	82-92
Subproductos de grano				
Bagazo de cerveza, seco	5	77	2	73-79
Maíz, gluten	2	89	4	86-91
Granos de destilería, seco	5	81	5	72-85
Proteínas animales				
Sangre, harina, “batch-dried”	12	63	17	29-86
Sangre, harina, “ring-dried”	10	81	6	72-90
Plumas, harina, hidrolizada	12	67	6	58-75
Pescado, harina, menhaden	13	80	5	73-88
Carne y hueso, harina	11	55	10	41-70

La variabilidad entre muestras de un mismo suplemento proteico sugiere que la mayor parte de esta variación puede ser atribuida al método de procesado, aunque también influyen otros factores como la procedencia y la calidad de la materia prima (tiempo y temperatura de almacenaje), diferencias entre técnicas y métodos de cálculo de digestibilidad, etc. Algunas fuentes de proteína como la soja son sometidas a distintos procesos para reducir su degradación en el rumen e incrementar su aporte de proteína al intestino. Sin embargo, en algunos casos el exceso de procesado puede reducir la digestibilidad de la proteína en el intestino (Windschitl y Stern, 1988). Por el contrario, Stern y col. (1985) observaron una mayor digestibilidad de las dietas suplementadas con habas de soja tostada respecto a las dietas con haba de soja cruda, y las diferencias se atribuyeron a la presencia de factores anti-tripsina termosensibles en la soja no tratada con temperatura. Pero el ejemplo más claro de variabilidad entre muestras se encuentra en la harina de sangre (Tabla 5). Howie y col. (1996) obtuvieron valores de digestibilidad intestinal de la harina de sangre que oscilaban entre el 72.0 y el 90.3 % para la harina de sangre “ring dried”, y entre el 28.8 y el 79.2 % para el método “batch dried”. Otros autores han aportado datos muy variables sobre la digestibilidad intestinal de la harina de sangre, con valores del 50 al 98 % en el estudio *in vitro* de Calsamiglia y Stern (1995), o valores de trabajos basados en la técnica de las bolsas móviles que oscilan entre el 99 % (Palmquist y col., 1993) y el 56 % (Erasmus y col., 1994). Esta variación en los valores de digestibilidad intestinal de la proteína entre muestras de un mismo suplemento puede tener un impacto importante en la disponibilidad de proteína para el animal y hace difícil establecer valores medios de digestibilidad. Un ejemplo de esta falta de precisión lo encontramos en las tablas presentadas en el NRC (2001), donde los valores de digestibilidad intestinal de la proteína han sido redondeados a ± 5

unidades de porcentaje. La única manera de asegurar la calidad de un producto como fuente de proteína para el animal sería el establecimiento de controles de calidad en la planta de procesado que incluyeran la determinación de la degradabilidad ruminal y de la digestibilidad intestinal de la proteína en los diferentes lotes producidos. Sin embargo, lo más frecuente sigue siendo recurrir a los valores de las tablas publicadas por los distintos sistemas de formulación.

La anterior edición del NRC (1989) ya reconocía que la digestión intestinal de la proteína puede variar entre alimentos. Sin embargo, la falta de datos suficientes hizo que se adoptara un valor constante de digestión intestinal de la proteína del 80 %, aplicable a todos los suplementos proteicos. Actualmente, los sistemas de formulación (NRC, 2001; CNCPS; Sistema PDI Francés) ya tienen en cuenta estas diferencias, y asignan un valor específico de digestibilidad intestinal a la fracción de proteína no degradable en el rumen de cada alimento, aunque cada sistema opta por métodos diferentes a la hora de obtener estos valores. El NRC (2001) recoge los resultados de 54 estudios para publicar sus tablas de valores de digestibilidad intestinal de la fracción de proteína no degradada en el rumen de los distintos alimentos. De estos 54 trabajos, 48 utilizan la técnica de las bolsas móviles con recuperación de las bolsas en las heces y 6 trabajos aplican el procedimiento *in vitro* de Calsamiglia y Stern (1995). El sistema PDI francés (Jarrige, 1989) utiliza otro enfoque para el cálculo de los valores de digestibilidad intestinal. En este caso, los valores han sido calculados a partir de estudios de digestibilidad realizados con ovejas, asumiendo que las diferencias entre alimentos en la excreción fecal de N por unidad de materia seca ingerida son debidas a la proteína indigestible de la dieta. Por otro lado, el CNCPS (Sniffen y col., 1992) utiliza análisis químicos para determinar los valores de digestibilidad intestinal de la proteína de cada alimento. Estos análisis

consisten en determinar las diferentes fracciones proteicas de cada alimento y multiplicar cada fracción por su digestibilidad. El modelo considera unas digestibilidades del 100, 100, 80 y 0 % para las fracciones proteicas B1, B2, B3 y C, respectivamente.

6- Aminoácidos

Al igual que en los monogástricos, los tejidos de los rumiantes necesitan un aporte suficiente de aminoácidos (AA), más que de proteína *per se*, para la síntesis de proteínas y las funciones de mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactación (Schwab, 1996). En la mayoría de situaciones, el déficit de uno o más AA puede limitar la producción de leche y de proteína láctea, mientras que un exceso de AA resulta en un aumento del catabolismo hepático y de la excreción de urea, con el consiguiente coste energético para el animal. De esta manera, la importancia de la formulación de raciones equilibradas en AA digestibles radica no sólo en un posible aumento de la producción, sino también en una mejora de la eficiencia de utilización del nitrógeno y, como consecuencia, en un ahorro energético para el animal. Además, puede permitir reducir el aporte nitrogenado de la ración y la contaminación ambiental derivada de la excreción del exceso de nitrógeno. En consecuencia, parece necesario considerar el equilibrio de los AA que llegan al intestino para ser absorbidos. Este equilibrio consiste en establecer una comparación entre el flujo de AA que llegan al intestino del rumiante con las necesidades en AA para la síntesis de leche y tejidos. Sin embargo, estudios recientes en vacas lecheras de alta producción sugieren que el perfil de AA de la digesta a nivel intestinal es muy variable (Clark y col., 1992), pudiéndose alejar en mayor o menor

grado del equilibrio óptimo. Como consecuencia, en los últimos años, los sistemas de formulación (Rulquin y col., 1993; O'Connor y col., 1993; NRC 2001) han incorporado la predicción de las necesidades y aportes de AA absorbibles en el intestino con el fin de equilibrar los aportes de la ración.

6.1- Aminoácidos esenciales y no esenciales

De los veinte AA principales que encontramos en las proteínas, diez se consideran aminoácidos esenciales (**AAE**). Los AAE no pueden ser sintetizados por los tejidos animales, o pueden ser sintetizados pero en cantidades insuficientes respecto a las necesidades metabólicas. Los diez aminoácidos esenciales son: arginina (**Arg**), histidina (**His**), isoleucina (**Ile**), leucina (**Leu**), lisina (**Lys**), metionina (**Met**), fenilalanina (**Phe**), treonina (**Thr**), triptófano (**Trp**) y valina (**Val**). Se considera que si el perfil de AAE absorbidos es similar al perfil requerido, la eficiencia de utilización para la síntesis de proteína es máxima y se reducen las necesidades de AAE totales (Schwab, 1996; NRC, 2001). Los aminoácidos no esenciales (**AANE**) son aquellos que pueden ser sintetizados a partir de metabolitos intermedios y grupos amino de los AA excedentes. A diferencia de los AAE, no existe evidencia de que el perfil de AANE afecte de manera importante a la eficiencia de utilización de los AA absorbidos para la síntesis de proteína. Si existe una deficiencia en uno o más AANE en relación a las necesidades, estos pueden ser sintetizados a partir de otro AANE o a partir de uno o más de los AAE que se hayan absorbido en exceso (Schwab, 1996; NRC, 2001).

6.2- Aminoácidos limitantes

La síntesis de proteína en los tejidos de la vaca depende del aporte de todos los aminoácidos que la componen. En el caso que la cantidad de un determinado AA sea insuficiente, la síntesis proteica se detiene y se considera a este AA como limitante. Los AAE que han sido identificados como los más limitantes en la mayoría de las raciones de vacuno lechero son la Lys y la Met. Esto se ha demostrado mediante la infusión de AA individuales o combinaciones de AAE en el abomaso o en el duodeno (Schwab, 1996) y la observación de sus efectos sobre la producción de proteína en la leche o sobre la retención de nitrógeno (NRC, 2001). Sin embargo, el calificativo de limitante no se puede aplicar directamente a ninguno de los AAE, ya que variará principalmente en función del nivel productivo del animal y de la ración ofrecida. En animales de baja producción, donde la mayoría de las necesidades de proteína metabolizable son cubiertas por la proteína microbiana, la Met, Lys, Arg e His podrían ser los AA más limitantes para la producción de leche (NRC, 2001). En niveles más altos de producción (por encima de los 35 litros), la proteína de la ración que pasa al intestino sin ser degradada en el rumen adquiere mayor importancia. Así, se ha determinado que la Lys es el principal AAE limitante en aquellas dietas que tienen como principal fuente de proteína productos derivados del maíz (corn gluten meal, granos de destilería...), mientras que la Met será limitante en dietas a base de soja o con fuentes proteicas de origen animal (Schwab, 1996).

Actualmente, no existe una evidencia clara que muestre que los AANE puedan ser limitantes (Rulquin y col., 2001). Schwab y col. (1976) obtuvieron los mismos resultados con la perfusión duodenal de todos los AA, que con la omisión de los AANE.

Igualmente, Fraser y col. (1991) no obtuvieron aumentos en la secreción de proteína tras la perfusión postruminal de diversos AANE. Sin embargo, el hecho de que los AANE puedan ser sintetizados por el animal no significa que no puedan limitar la producción en determinadas circunstancias. Podría darse el caso que la velocidad de síntesis de un determinado AANE no fuera suficiente como para cubrir las necesidades del animal. Por ejemplo, se ha visto que la cisteína y la cistina (producto de la oxidación de la cisteína) pueden cubrir el 50 % del total de las necesidades de AA azufrados, y que la tirosina puede aportar aproximadamente el 50 % de las necesidades de tirosina y fenilalanina (NRC, 2001). Si esto es así, a menudo se deberá recurrir al uso de Met y Phe para sintetizar cisteína y tirosina, y en el caso que la Met y Phe sean limitantes se agravará aún más su deficiencia. Por el contrario, los suplementos ricos en cisteína/cistina y tirosina pueden ser útiles a la hora de reducir las necesidades de Met y Phe.

6.3- Necesidades de aminoácidos

Las necesidades de AA de la vaca lechera no se conocen con mucha certeza (NRC 2001). Sin embargo, los sistemas de formulación actuales incorporan modelos de predicción de las necesidades de AA basándose en tres técnicas diferentes: el método factorial, el método dosis-respuesta directo y el método dosis-respuesta indirecto.

6.3.1- El Método factorial

El Cornell Net Carbohydrate and Protein System (**CNCPS**) desarrolló un submodelo (O'Connor y col., 1993) que intenta cuantificar las necesidades de AAE

utilizando el método factorial, un cálculo matemático consistente en separar las necesidades en componentes individuales e independientes. La ventaja de un modelo matemático es que permite predecir las necesidades de AA bajo una amplia variedad de condiciones del animal, de la dieta o del ambiente. El cálculo de las necesidades de AA absorbibles mediante este método requiere el conocimiento de: 1) las necesidades de proteína neta para mantenimiento, crecimiento, gestación y lactación; 2) la composición en AA de los productos del punto anterior, y 3) las eficiencias de utilización de los AA absorbidos para mantenimiento y formación de los productos (mostradas en la Tabla 6). Conociendo estos tres factores, las necesidades de AA absorbibles se obtienen multiplicando las necesidades de proteína neta por la composición en AA del producto formado y dividiendo por las eficiencias de utilización de los AA individuales absorbidos para la formación del producto.

Tabla 6. Utilización de los aminoácidos individuales absorbidos para las distintas funciones fisiológicas. (Adaptado de O'Connor y col., 1993).

Aminoácido	Mantenimiento	Gestación	Lactación
Metionina	0.85	0.85	0.98
Lisina	0.85	0.85	0.88
Histidina	0.85	0.85	0.90
Fenilalanina	0.85	0.85	1.00
Triptófano	0.85	0.85	0.85
Treonina	0.85	0.85	0.83
Leucina	0.66	0.66	0.72
Isoleucina	0.66	0.66	0.62
Valina	0.66	0.66	0.72
Arginina	0.85	0.66	0.42

Sin embargo, para perfeccionar este método, es necesario seguir investigando para obtener estimaciones más ajustadas de algunos de estos parámetros (contenido en AA de proteínas tisulares o de los productos de la gestación, eficiencias de utilización de los AA para determinadas funciones fisiológicas, etc.) que pueden afectar de manera importante a la predicción de las necesidades de AA absorbibles.

6.3.2- El Método dosis-respuesta directo

Una alternativa más directa para definir las necesidades de AA consiste en utilizar el método dosis-respuesta. El mayor progreso obtenido en vacas lecheras con este método ha sido en la estimación de las necesidades de lisina (**Lys**) y metionina (**Met**). Se han utilizado dos modalidades del método dosis-respuesta. La primera es el método dosis-respuesta directo (Schwab y col., 1992), que consiste en incrementar de forma gradual los aportes postruminales de Lys o Met mediante infusión abomasal o intestinal, y a la vez medir las respuestas productivas y los flujos de AA al intestino delgado. Según este método, para un contenido y producción máximos de proteína en leche, el aporte de Lys debe contribuir en un 15.0 % del total de AAE de la digesta duodenal, y el de Met en un 5.3 % del total de AAE, siempre que los niveles de Lys de la digesta duodenal se aproximen al 15 % del total de AAE (Schwab, 1996).

6.3.3- El Método dosis-respuesta indirecto

La segunda modalidad para estimar las cantidades óptimas de Lys y Met en la proteína metabolizable para vacas lecheras es el método dosis-respuesta indirecto,

descrito por Rulquin y col. (1993) y adoptado por el NRC (2001). Este método implica 3 pasos: 1) calcular los niveles de Lys y Met de la digesta duodenal de los grupos control y tratamiento en experimentos en los que se hayan suministrado niveles crecientes de Lys, o Met, o ambos AA, y en los que a la vez se mida la respuesta productiva; 2) calcular en cada experimento mediante regresión lineal “valores referencia de producción” para valores fijados de concentración de Lys y Met en la digesta duodenal, que son valores intermedios de los valores más altos y los más bajos encontrados en la mayoría de experimentos con Lys y Met, y; 3) calcular las respuestas productivas (valores positivos y negativos) relativas a los “valores referencia de producción” para los grupos control y tratamiento. Basándose en este método, Rulquin y col. (1993) estimaron las necesidades de Lys y Met para la vaca lechera en lactación en un 7.3 % y un 2.5 % respectivamente, del total del aporte de AA digestibles, mientras que el NRC (2001) recomienda unos valores de Lys y Met del 7.2 % y el 2.4 % del total de la proteína metabolizable (**PM**), valores muy parecidos a los recomendados por Rulquin y col. (1993). Sin embargo, parece ser que el contenido en proteína de la leche disminuye de forma drástica cuando la dieta aporta menos del 6.8 % de Lys o del 2.0 % de Met. Como consecuencia, parece razonable considerar estos valores de Lys y Met como niveles críticos.

Conseguir las concentraciones óptimas de los AA más limitantes en la PM es el primer paso para obtener dietas equilibradas en AA. Sin embargo, se necesitan más trabajos de investigación para determinar las recomendaciones de aporte del resto de AA en vacas lecheras. Estos trabajos son escasos debido a que no existen formas protegidas de estos AA que escapen a la degradación ruminal, y se deben realizar técnicas de perfusión digestiva o intravenosa. A partir de los resultados publicados, Rulquin y col. (2001) obtuvieron las curvas de respuesta de la producción a las variaciones del aporte

intestinal de cada uno de los AAE. Según estas curvas, las recomendaciones se podrían situar: entre el 2.5 y el 3.2 % para la His; por encima del 8.8 % para la Leu; por encima del 5.3 % para la Val; por encima del 5 % para la Ile; entre el 4 y el 5 % para la Phe; por encima del 4 % para la Thr, y por encima del 4.3 % para la Arg. No obstante, es necesario seguir trabajando en la obtención de estos valores para conocer mejor las necesidades en AA de la vaca lechera y poder cubrirlas ajustando el contenido en proteína y AA de las raciones.

6.4- Aportes de aminoácidos

El avance en la formulación de raciones en base a AA requiere una buena predicción de la composición en AAE de la proteína que llega al intestino. Los AA que llegan al intestino delgado para ser absorbidos son aportados principalmente por la proteína microbiana sintetizada en el rumen, por la proteína de la ración que escapa de la degradación en el rumen y en menor medida por las secreciones endógenas al tracto digestivo (Clark y col., 1992; O'Connor y col., 1993; NRC, 2001; Rulquin y col., 2001). Los sistemas actuales de formulación para vacuno lechero consideran la importancia de la composición en AA de la proteína que llega al intestino delgado, e incluyen ecuaciones para estimar el flujo de AA de las diferentes fracciones proteicas (proteína microbiana, proteína no degradable en el rumen y proteína endógena) en sus modelos de predicción.

Los modelos de predicción basados en el método factorial asignan un valor de AA a cada una de las fracciones proteicas (proteína microbiana, proteína de la ración no degradada en el rumen y proteína endógena) estimadas por el modelo. Esto requiere una

gran precisión a la hora de predecir los flujos de cada una de las fracciones proteicas y de asignarles un valor para cada uno de los AA. De hecho, los errores asociados a cada uno de los pasos se van sumando, de manera que en función del número de pasos implicados en el proceso el error puede llegar a ser importante. El Cornell Net Carbohydrate and Protein System (O'Connor y col., 1993), el NRC (1996) y el modelo propuesto por Rulquin y col. (2001) son algunos de los sistemas que utilizan el método factorial para predecir el aporte de AA al intestino delgado. Sin embargo, el NRC (2001) opta por un modelo semi-factorial o de regresión múltiple, desarrollado a partir de datos obtenidos de 57 trabajos publicados con un total de 199 tratamientos. Esto permite adaptar el modelo a los datos observados y corregir parcialmente los errores de las variables obtenidas de forma mecanística. Este modelo elimina la necesidad de asignar un valor de AA a la proteína microbiana y a la proteína endógena (sólo hay que asignar valores de AA a los alimentos), e implica el desarrollo de una ecuación para cada uno de los AAE y una ecuación que predice el flujo de los AAE totales.

6.4.1- Variabilidad del perfil de aminoácidos del contenido intestinal

Tradicionalmente se ha asumido que el perfil de AA que llegan al duodeno para ser absorbidos es poco variable y muy parecido al de la proteína microbiana (Oldham y Tamminga, 1980). Sin embargo, Rulquin y Vérité (1993) realizaron una extensa revisión de datos bibliográficos que mostraba importantes variaciones en la composición aminoacídica del contenido intestinal bajo diferentes condiciones de alimentación (Tabla 7). En los bovinos, esta variación se situaría entre el 5 y el 10 % para la lisina, treonina, isoleucina, fenilalanina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico y alanina; entre el 10 y

el 12 % para la histidina, arginina, valina, leucina y tirosina; y más del 15 % de variabilidad en el caso de la metionina, glicina y prolina (Tabla 7).

Así, contrariamente a lo que generalmente estaba admitido, el perfil de AA del contenido digestivo del rumiante presenta una variabilidad considerable. Parte de esta variación podría ser atribuida a factores de orden metodológico como la obtención de la digesta o el análisis de los AA. Sin embargo, Hvelplund y Madsen (1989) obtuvieron en su laboratorio unos coeficientes de variación elevados que atribuyeron a posibles cambios en la contribución parcial de la proteína microbiana y de la proteína no degradable de la ración y, también, a la variabilidad en el perfil de AA de cada fracción.

Tabla 7. Variabilidad en la composición en aminoácidos (g/100 g de AA) de la digesta intestinal en bovinos (adaptado de Rulquin y Vérité, 1993).

Aminoácido	Media	C.V.	Mín.	Máx.
Lys	6.88	9.7	4.82	8.42
His	2.21	11.9	1.34	2.89
Arg	4.96	10.6	3.76	7.07
Thr	5.32	7.0	4.36	6.16
Met	1.97	17.6	1.27	2.99
Val	6.01	10.8	4.03	7.33
Ile	5.45	8.0	4.44	6.73
Leu	8.87	10.5	6.77	11.90
Phe	5.12	7.1	4.13	6.06
Asp	10.94	6.6	8.9	12.23
Ser	5.12	8.8	4.01	7.19
Glu	14.52	8.5	11.93	18.08
Gly	6.24	19.2	3.2	10.10
Ala	6.92	5.6	5.54	7.79
Tyr	4.47	11.9	2.98	5.87
Pro	5.01	15.3	3.63	7.56

Revisión bibliográfica de 133 raciones
C. V. = coeficiente de variación

De esta manera, cuando el flujo de proteína microbiana es relativamente alto, por ejemplo en animales alimentados con dietas que incluyan únicamente nitrógeno no proteico o fuentes de proteína degradable, se espera que el perfil de AA en el duodeno sea más parecido al de la proteína microbiana. Sin embargo, a medida que aumenta la proporción de proteína no degradable de la ración, la composición en AA del contenido duodenal tiende a desviarse hacia el perfil marcado por la proteína de la ración, difiriendo del perfil de la proteína microbiana (Rulquin y Vérité, 1993). Según Rulquin y col. (2001), la composición aminoacídica de la ración explicaría un 32 % de la variabilidad total del perfil de AA del contenido digestivo, mientras que la cantidad de proteína no degradable de la ración explicaría un 22 %. El perfil de AA de las fuentes de proteína no degradable difiere, en mayor o menor medida, del perfil de AA de la proteína microbiana (Tabla 8). Además, existe una gran variedad de suplementos proteicos en cuanto a su perfil de AAE y a la contribución de los AAE a la proteína total (Tabla 8). Esto hace que gran parte de la variación en el perfil de AA absorbibles del contenido duodenal quede explicada por la cantidad y composición en AA de las proteínas no degradables, en especial en animales de alta producción en los que la contribución parcial de la proteína de la ración que escapa de la degradación ruminal cobra especial relevancia (Rulquin y Vérité, 1993; NRC, 2001). Así, las vacas lecheras de alta producción son las más susceptibles a un posible desequilibrio de AA que se traduciría, en la mayoría de casos, en una disminución de la tasa de caseína en la leche (Rulquin y col., 2001).

Tabla 8. Perfil de aminoácidos (% del total de aminoácidos esenciales) de la leche, el tejido muscular, las bacterias ruminales y algunos suplementos proteicos (adaptado del NRC, 2001).

Ingrediente	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val	AAE (% PB)
Leche	7.2	5.5	11.4	19.5	16.0	5.5	10.0	8.9	3.0	13.0	-
Tejido muscular	16.8	6.3	7.1	17.0	16.3	5.1	8.9	9.9	2.5	10.1	-
Bacterias ruminales	10.2	4.0	11.5	16.3	15.8	5.2	10.2	11.7	2.7	12.5	-
Alfalfa (heno)	12.5	4.7	10.3	17.9	12.4	3.8	11.6	10.6	3.6	12.7	41.2
Ensilado de maíz	6.2	5.7	10.6	27.2	7.9	4.8	12.1	10.1	1.4	14.1	31.6
Corn gluten meal	7.1	4.7	9.1	37.2	3.7	5.2	14.1	7.5	1.2	10.3	45.2
Harina de soja	16.2	6.1	10.1	17.2	13.9	3.2	11.6	8.7	2.8	10.2	45.3
Harina de sangre	7.8	11.3	2.2	22.7	15.9	2.1	12.1	7.7	2.8	15.4	56.4
Harina de pescado	13.1	6.4	9.2	16.2	17.2	6.3	9.0	9.4	2.4	10.8	44.5

6.4.2- Aportes de aminoácidos microbianos

La proteína microbiana sintetizada en el rumen es una fuente de AA absorbibles de muy buena calidad, ya que su perfil de AAE es muy parecido al de la leche y al del tejido muscular (Tabla 8), y su digestibilidad intestinal aparente es elevada (Clark y col., 1992; Polan, 1992; Schwab, 1996), de manera que tendría sentido formular raciones que maximizaran la síntesis y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana en el rumen, con el fin de aprovechar su alto valor biológico (Stern y col., 1994b). En la mayoría de vacas lecheras de alta producción con una dieta equilibrada, la proteína microbiana sintetizada en el rumen aporta un 50 % o más de los AA absorbibles (Schwab, 1996). Sin embargo, en las vacas de alta producción el aporte de proteína microbiana no es suficiente, y parte de la proteína de la ración debe escapar de la degradación en el rumen

y ser digerida en el intestino hasta llegar a sus componentes básicos, los AA, con el objetivo de satisfacer las necesidades de AA del animal (Chalupa y Sniffen, 1996). Así, aunque el valor de la proteína microbiana como fuente de AA para el rumiante es indiscutible, el alto nivel de producción exigido a las vacas lecheras en los últimos años, hace que las fuentes de proteína no degradable en el rumen cobren mayor importancia a la hora de cubrir las necesidades de AA.

6.4.3- Aportes de aminoácidos a través de la proteína no degradable de la ración

6.4.3.1- Alteración del aporte de aminoácidos con suplementos proteicos

Los ingredientes con mayor capacidad para influir en el perfil de AA de la proteína absorbible son las fuentes de proteína “bypass” o de baja degradabilidad ruminal, es decir, ingredientes ricos en proteínas resistentes al ataque de los microorganismos ruminales. Entre los múltiples suplementos proteicos se encuentran diversas concentraciones de AA específicos (Tabla 8). Todas las fuentes de proteína no degradable en el rumen tienen al menos una carencia en su composición aminoacídica cuando se comparan con la composición en aminoácidos de la leche. Los suplementos proteicos de origen vegetal tienden a ser pobres en lisina y metionina. Quizás la harina de soja, aunque un poco pobre en metionina, es una de las fuentes de proteína no degradable más equilibradas (Polan, 1992) y, al igual que la alfalfa, puede contribuir de manera importante al aporte de lisina (Polan, 1992; Kung y Rode, 1996). El maíz y sus subproductos (p.e. corn gluten meal) son pobres en lisina pero son buenas fuentes de leucina y metionina. Sólo las fuentes de proteína animal tienen niveles de los principales

AA potencialmente limitantes (Lys y Met) superiores a los requeridos para toda la ración. La harina de sangre (ahora prohibida en la Unión Europea) es una fuente excelente de lisina, pero sólo la harina de pescado proporciona cantidades considerables de lisina y metionina a la vez (Chalupa y Sniffen, 1996).

Como vemos, es evidente que no existe la fuente perfecta de AA. Sin embargo, es posible seleccionar combinaciones de suplementos proteicos de manera que la digesta intestinal se acerque a las proporciones óptimas de AA requeridas por el rumiante (Titgemeyer y col., 1989; Cecava y col., 1990; Calsamiglia y col., 1995; Polan, 1992). No obstante, la utilización de los AA de la ración no es tan simple, ya que hay que tener en cuenta las transformaciones que tienen lugar en el rumen, las diferencias en la digestibilidad y absorción de los AA, y la utilización de AA para otras funciones metabólicas a parte de la síntesis de leche.

6.4.3.2- Degradación de aminoácidos en el rumen

Se debe considerar que los suplementos proteicos están compuestos por una mezcla de proteínas, cada una de ellas con diferentes propiedades (p.e. diferente resistencia a la degradación microbiana en el rumen). Fácilmente, esto puede llevar a pensar que el perfil de AA de la porción de alimento que escapa de la degradación en el rumen pueda quedar alterado respecto al perfil de AA del alimento original. Este aspecto ha sido objeto de diversos estudios en los últimos años y ha sido fuente de resultados contradictorios. Si bien los sistemas de formulación actuales consideran que la proteína de la ración que llega al intestino delgado conserva su perfil original de AA (Rulquin y Vérité, 1993; NRC, 2001) o el perfil de AA de la fracción insoluble (O'Connor y col.,

1993), existen trabajos que muestran diferencias evidentes entre el perfil de AA de la proteína de la ración antes y después de su paso por el rumen (Crooker y col., 1987; Susmel y col., 1989; Erasmus y col., 1994).

Aunque se pueden observar algunos patrones en cuanto a la degradabilidad de los AA individuales, en general esta suele ser dependiente del alimento. La lisina, considerada uno de los principales AA limitantes, parece ser uno de los AA más degradables en el rumen en comparación con otros AAE. En los trabajos de Erasmus y col. (1994) y O'Mara y col. (1997) su concentración en el residuo después de la incubación ruminal disminuyó o tendió a disminuir en la mayoría de los suplementos estudiados. Algunos trabajos *in vivo* realizados con vacas canuladas (Stern y col., 1983; King y col., 1990) y trabajos *in vitro* (Blake y Stern, 1988) también apuntan a una degradación preferente de la Lys frente a otros AA en la mayoría de suplementos. González y col. (2001) realizaron un estudio de las acciones ruminales sobre el perfil de AA en varios suplementos proteicos mediante la técnica de las bolsas de nylon. En este trabajo se constató un descenso muy importante en el contenido de lisina de la proteína no degradable del grano de maíz (reducción del 84.6%), lo cual incrementa el déficit de lisina de este alimento. Este descenso en la proporción de lisina tras la incubación ruminal también fue evidente en el caso del gluten feed (reducción del 15.4%). Este hecho reafirma la observación de Rulquin (1992) de que la suplementación postruminal de lisina, especialmente en dietas ricas en maíz, tiene efectos positivos. En cuanto a la metionina, aunque se ha dicho que es uno de los AA más resistentes a la degradación ruminal (Tamminga, 1979; O'Mara y col., 1997), varios autores (Blake y Stern, 1988; Susmel y col., 1989; Titgemeyer y col., 1989) coinciden en afirmar que su degradación en el rumen es superior a la del total de AA en la mayoría de los suplementos proteicos

estudiados. Otros trabajos (Crooker y col., 1987; Erasmus y col., 1994) muestran resultados variables respecto a la degradación ruminal de la metionina en función del suplemento proteico. Entre los AAE, los de cadena ramificada y, en particular, la leucina y la isoleucina, parecen ser en general más resistentes a la degradación microbiana en el rumen que el total de AA (Crooker y col., 1987; Titgemeyer y col., 1989; Susmel y col., 1989; Erasmus y col., 1994; O'Mara y col., 1997; González y col., 2000). Para el resto de AA se hace más difícil establecer una tendencia general en cuanto a su degradación en el rumen, ya que ésta suele depender del suplemento proteico considerado. La Tabla 9 nos muestra un ejemplo de la variabilidad entre suplementos proteicos en cuanto a la degradación ruminal de los aminoácidos individuales. En esta tabla se muestran los valores de escape del rumen de cada AA respecto al valor de escape del total de AA, de manera que valores superiores a 1 indican que el AA se degrada menos que el total de AA aportados por un suplemento determinado; los valores inferiores a 1 indican que el AA se degrada más que la fracción de AA totales (Titgemeyer y col., 1989).

Tabla 9. Escape relativo del rumen de los aminoácidos (AA) de la harina de soja (SBM), gluten de maíz (CGM), harina de sangre (BM) y harina de pescado (FM) (Extraído de Titgemeyer y col., 1989).

Aminoácido	Fuente de proteína			
	SBM	CGM	BM	FM
Lys	1.45	1.20	1.02	0.95
Met	a	0.74	0.46	0.80
Cys	a	0.94	0.80	0.91
His	1.04	0.85	0.94	0.87
Arg	0.90	0.96	0.97	0.93
Thr	1.21	1.14	1.11	1.11
Val	1.73	1.38	1.11	1.24
Ile	1.63	1.31	1.24	1.22
Leu	1.00	0.86	0.96	0.96
Phe	1.37	0.99	0.98	1.22
Tyr	2.10	0.93	0.84	1.28
AA Totales	1.00	1.00	1.00	1.00

^a Valores negativos no aportados.

Así, se podría decir que las modificaciones del perfil de AA que tienen lugar en el rumen difieren en función del ingrediente considerado. Aunque no se conocen las causas de esta variabilidad, se podría considerar que entre los principales factores implicados están las características intrínsecas de las proteínas (composición, estructura, solubilidad) y AA, y los procesos (calor, presión, procesos químicos) aplicados a los alimentos. Sin embargo, estas variaciones también resultan, en cierta medida, de las diferentes metodologías utilizadas. Titgemeyer y col. (1989) desarrollaron un estudio *in vivo* con terneras canuladas en el rumen, duodeno e íleon, con el fin de medir en cuatro suplementos proteicos la cantidad de N y AA que escapaban del rumen y que

desaparecían en el intestino delgado. Para ello se basaron en la técnica de las pendientes. Esta técnica consiste en formular dietas que incluyan niveles crecientes de un determinado suplemento proteico, pero que a la vez garanticen una síntesis de proteína microbiana similar, ya que asume que la contribución de la proteína microbiana al flujo duodenal es la misma para todas las dietas. De esta manera, al hacer una regresión entre el flujo duodenal de AA y la ingestión de AA, el cambio en el flujo de AA puede ser atribuido exclusivamente a los AA aportados por el suplemento proteico que no hayan sido degradados en el rumen. Sin embargo, este tipo de trabajos son muy costosos (requieren el uso de animales canulados en el intestino) y están sujetos a múltiples factores de variación difíciles de controlar en un animal vivo (nivel de ingestión, ritmos de paso, etc.) que pueden alterar el flujo de AA de la ración al intestino delgado y confundir los resultados. Estas dificultades son el motivo de que los estudios *in vivo* sean tan escasos (Stern y col., 1983; Titgemeyer y col., 1989; King y col., 1990). La mayoría de estudios (Crooker y col., 1986, 1987; Susmel y col., 1989; Erasmus y col., 1994; Maiga y col., 1996; O'Mara y col., 1997) utilizan la técnica *in situ*, consistente en la incubación de las muestras en el rumen mediante bolsas de nylon. No obstante, el hecho de realizar una incubación puntual sin considerar los ritmos de paso, las diferencias en el tiempo de incubación y la contaminación bacteriana, son algunos de los factores que aumentan las discrepancias entre resultados y que pueden cuestionar su validez. Crooker y col. (1986, 1987) observaron que la contaminación bacteriana representaba una proporción significativa del N en los residuos de las muestras incubadas en el rumen mediante bolsas de nylon. La corrección de la contaminación bacteriana permitió detectar varias alteraciones en la composición en AA de los alimentos debidas a su paso por el rumen, que no se observaron cuando no se realizó este ajuste. González y col.

(2001) en un estudio *in situ* en el que se evaluaron varios suplementos mediante la técnica de las bolsas de nylon corregida por la contaminación bacteriana, observaron que el nivel de contaminación bacteriana de los residuos difería en función del alimento estudiado, siendo esta muy poco importante en el caso de la harina de pescado, elevada en el grano de maíz, en la pulpa de remolacha deshidratada y en el heno de alfalfa, e intermedia en el gluten feed. La falta de corrección de la contaminación bacteriana puede producir modificaciones importantes de los resultados, dado que las diferencias entre el perfil de AA de las bacterias y el perfil de AA de estos suplementos es importante.

En consecuencia, dada la falta de valores precisos de degradación de AA y las limitaciones metodológicas existentes, resulta común la asunción de que la composición en AA de las proteínas de la ración no es sustancialmente modificada por la degradación ruminal, aunque esto pueda llevar a imprecisiones en la estimación del flujo de AA de la ración al intestino.

6.4.3.3- Digestión intestinal de los aminoácidos de la ración

La digestibilidad de los AA en el intestino delgado es un factor tan importante como su nivel de resistencia a la degradación en el rumen a la hora de evaluar la capacidad de un alimento para aportar AA al animal. En la actualidad existe escasa información acerca de la digestión intestinal de los AA individuales, aunque sin duda, esta información resultaría de gran valor a la hora de formular las raciones en base a AA tal como pretenden los sistemas de formulación actuales (O'Connor y col., 1993; NRC, 2001; Rulquin y col., 2001). La disponibilidad en el intestino de los AA que escapan de

la degradación ruminal ha sido poco estudiada *in vivo* (Santos y col., 1984; Titgemeyer y col., 1989), ya que la mayoría de los trabajos existentes han utilizado la técnica de las bolsas móviles (Cros y col., 1992ab; Erasmus y col., 1994; O'Mara y col., 1997; Van Straalen y col., 1997; Taghizadeh y col., 2005). Sin embargo, como ya se ha comentado en el apartado de digestión intestinal de proteínas, estas técnicas presentan diversos inconvenientes que podrían afectar a los resultados. En ese apartado también se ha citado una técnica más reciente, la técnica de los tres pasos desarrollada por Calsamiglia y Stern (1995), para la estimación de la digestión intestinal de proteínas en rumiantes de una forma rápida y económica. No obstante, esta técnica no permite la estimación de la digestibilidad intestinal de los AA individuales, por lo que se hace necesario trabajar en el desarrollo de una técnica rápida y fiable para el estudio de la digestibilidad de los AA. Dada la falta de datos, los sistemas de formulación optan por no considerar un valor diferencial de digestión intestinal para cada AA, sino que otorgan un valor de digestibilidad a cada fuente de proteína, y consideran que todos los AA que componen esta proteína son digeridos en la misma proporción.

Diversos trabajos (Titgemeyer y col., 1989; Erasmus y col., 1994; O'Mara y col., 1997) coinciden en afirmar que, en general, el perfil de AA absorbidos en el intestino es parecido al perfil de AA de la proteína no degradada en el rumen y distinto al de la proteína original, aunque reconocen algunas excepciones al observar que ciertos AA son más digestibles que otros. Estudios realizados *in vivo* en animales canulados (Santos y col., 1984) o mediante la técnica de las bolsas móviles (Van Straalen y col., 1997) muestran una digestión preferencial de los AAE sobre los AANE en el intestino delgado. Titgemeyer y col. (1989) observaron en un estudio *in vivo* en el que se evaluaron 4 suplementos proteicos, que mientras los AA cisteína, histidina y treonina fueron menos

digestibles que la media de todos los AA, la arginina resultó ser más digestible. Erasmus y col. (1994), utilizando la técnica de las bolsas móviles, observaron que algunos AA como la prolina, glicina, alanina y cisteína tendieron a ser menos digestibles, y que el glutámico, leucina, tirosina, fenilalanina, arginina y metionina fueron aparentemente más digestibles que el total de AA en la mayoría de los 12 suplementos proteicos estudiados. Estos resultados, coincidiendo con los de Cros y col. (1992a,b), Van Straalen y col. (1997), Harstad y Prestløkken (2000) y Taghizadeh y col. (2005), sitúan a la arginina entre uno de los AA más digestibles en el intestino, mientras que apuntan a la glicina como uno de los menos digestibles. Esto explicaría una diferencia marcada entre la desaparición en el intestino de AAE y la de AANE. La metionina es otro de los AA que en general presenta una digestión postruminal superior a la del resto de AA, como muestran los trabajos de Santos y col. (1984), Cros y col. (1992a,b) o Erasmus y col. (1994), aunque su digestibilidad podría variar en función del suplemento proteico (Titgemeyer y col., 1989; O'Mara y col., 1997). En cuanto a la lisina, Titgemeyer y col. (1989) observaron una baja digestibilidad de la lisina proveniente del corn gluten meal, que atribuyeron a una posible existencia de reacciones de Maillard entre residuos de lisina y carbohidratos, mientras que en las harinas de soja, sangre o pescado la digestibilidad de la lisina fue algo superior a la del total de AA. O'Mara y col. (1997) también observaron una digestión de la lisina extremadamente baja en los productos derivados del maíz, mientras que su desaparición en el intestino fue marcadamente superior en las muestras de harina de pescado. Finalmente, Taghizadeh y col. (2005), utilizando la técnica de las bolsas móviles obtuvieron una digestibilidad de la lisina menor que la del total de AA en el grano de maíz, mientras que su digestibilidad superó a la del total de AA en suplementos como el heno de alfalfa, la harina de carne, la harina

de semilla de algodón, la harina de soja, el heno de cebada y el salvado de trigo. Estos resultados vuelven a plantear el problema con la lisina en las dietas ricas en maíz, ya que al echo de que el maíz de por sí es pobre en lisina, al parecer habría que sumarle que esta lisina es muy susceptible de ser degradada en el rumen (según las observaciones del apartado anterior), y que la poca lisina que llega al intestino tiene una digestibilidad muy baja. En estos casos, sería muy recomendable reforzar los aportes de lisina por otras vías.

Los datos aportados indican que existen variaciones en la digestión intestinal de AA individuales, tanto dentro de un mismo suplemento proteico como entre diferentes alimentos (Titgemeyer y col., 1989; Cros y col., 1992a,b). Estas diferencias requerirían el uso de diferentes coeficientes de digestibilidad intestinal para los AA individuales dentro de cada suplemento. Esta información permitiría la selección de proteínas con elevada digestibilidad de aquellos AA más susceptibles de ser limitantes en cada caso y aumentaría la precisión de los actuales sistemas de formulación. Sin embargo, la dificultad de determinar la degradabilidad ruminal y la digestibilidad intestinal de AA y la falta de valores de degradabilidad ruminal y de digestibilidad intestinal de AA específicos para cada alimento, siguen siendo factores limitantes para la mejora de la formulación de raciones para rumiantes en base a AA.

7- Conclusiones

La incorporación de la predicción de las necesidades y aportes de aminoácidos absorbibles en intestino delgado a los actuales sistemas de formulación para rumiantes (Rulquin y col., 1993; O'Connor y col., 1993; NRC, 2001) ha sido, sin duda, un importante avance en la nutrición del vacuno lechero. No obstante, el conocimiento de las necesidades y aportes de AA específicos para el rumiante es todavía muy limitado (NRC, 2001), de manera que para conseguir unas estimaciones más ajustadas es necesario disponer de mayor información. Un paso importante en el desarrollo de estos sistemas es el conocimiento de la composición de aminoácidos de la proteína de la ración que no se degradada en el rumen y su digestión intestinal. Sin embargo, los efectos de la fermentación ruminal sobre el perfil de aminoácidos de la proteína no degradable no están claros y son fuente de controversia. Por otro lado estos sistemas, aunque reconocen diferencias en la digestibilidad intestinal de las proteínas, asumen un valor de digestibilidad intestinal constante para todos los aminoácidos que constituyen una misma proteína. La escasa información existente acerca de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales y la falta de métodos rápidos y fiables para su determinación, hacen que los sistemas de racionamiento no tengan en cuenta este aspecto a la hora de formular. En consecuencia, con el fin de mejorar la precisión de la formulación de raciones para el rumiante, es justificado profundizar en el efecto que la fermentación microbiana tiene sobre el perfil de aminoácidos de la proteína absorbible, así como potenciar el estudio de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales.

8- Objetivos

Esta tesis doctoral se planteó debido a la falta de valores concretos de degradabilidad ruminal y de digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales procedentes de suplementos proteicos. Dadas las dificultades que existen para obtener estimaciones *in vivo* de forma precisa, se optó por la utilización de sistemas *in vitro* que nos permitieran reducir las fuentes de variación asociadas al animal. Es por ello que los objetivos generales de la presente tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Evaluar los efectos de la incorporación a la ración de niveles crecientes de proteína no degradable en el rumen procedente de suplementos proteicos sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes en un sistema de cultivo continuo de flujo doble.
2. Determinar el escape ruminal relativo de los aminoácidos de suplementos proteicos en un sistema de cultivo continuo de flujo doble.
3. Desarrollar un método rápido y fiable para la determinación de la digestión intestinal de proteínas que permita la obtención de valores de digestión intestinal de aminoácidos individuales.
4. Estimar la digestión intestinal de los aminoácidos individuales procedentes de suplementos proteicos.

CAPÍTULO 2

Experimento 1:

**Rumen microbial degradation of amino acids from heat-treated soybean meal and
corn gluten meal in continuous culture**

1- Abstract

Eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in three replicated periods to study the effects of diets containing increasing levels of heat-treated soybean meal (HSBM) or corn gluten meal (CGM) on microbial fermentation, nutrient flow and relative ruminal escape of dietary amino acids (AA). Diets were isonitrogenous and composed of basal ingredients (71.2% dry matter basis) and a protein supplement (28.8% dry matter basis). Treatments consisted of a mix of a non-protein N supplement (urea and tryptone) and a 0, 33, 66, or 100% of HSBM or CGM. Increasing the level of HSBM or CGM in diets reduced dry and organic matter digestion. However, fibre digestion, total volatile fatty acids concentrations and molar proportions of acetate, propionate and butyrate were not affected by treatment. Ammonia N concentration and protein degradation decreased, and nonammonia and dietary N flows increased as the level of HSBM or CGM increased. Efficiency of microbial protein synthesis and microbial N flow varied within HSBM diets but were not affected in CGM diets. Diets with CGM provided the largest flow of total, essential and nonessential AA, and the lowest flow of Lys. Relative ruminal escape of AA from HSBM and CGM suggested that Lys in CGM was the most extensively degraded AA, and Tyr, Asp and Glu were degraded the least in both supplements. Results indicate that ruminal degradation of individual AA differs within sources, although fixing specific values is difficult.

(Key words: protein supplement, microbial fermentation, amino acid, ruminal degradation)

Abbreviation key: **CGM** = corn gluten meal, **CGM-0**, **CGM-33**, **CGM-66**, **CGM-100** = diets containing 0, 33, 66 or 100% over supplemental protein of corn gluten meal, **EAA** = essential amino acids, **HSBM** = heat-treated soybean meal, **HSBM-0**, **HSBM-33**, **HSBM-66**, **HSBM-100** = diets containing 0, 33, 66 or 100% over supplemental protein of heat-treated soybean meal, **LAB** = liquid associated bacteria, **NEAA** = nonessential amino acids, **SAB** = solid associated bacteria, **SBM** = soybean meal.

2- Introduction

Ruminants have metabolic requirements for AA rather than for proteins per se (Schwab, 1996; NRC, 2001). Current feeding systems (O'Connor et al., 1993; NRC, 2001) include the prediction of AA requirements and supply to the small intestine. Protein reaching the small intestine is composed of microbial, dietary and endogenous protein. Supply of absorbable AA of dietary origin depends of the amount of dietary protein escaping ruminal degradation, intestinal digestibility of the AA that escape ruminal degradation, and the AA composition of rumen undegraded intestinally digested protein. Although some authors consider that escape protein has the same AA profile as the ingested protein (Rulquin and Vérité, 1993; NRC 2001), or as the insoluble protein fraction (O'Connor et al., 1993), there is considerable evidence that the AA profile of ingested and undegradable protein is different (Crooker et al., 1987; Susmel et al., 1989; Erasmus et al., 1994), and these differences vary according to each feedstuff. Thus, some authors (Crooker et al., 1987; Erasmus et al., 1994) observed that the degradation of Met was feed-dependent. However, these results were obtained using the in situ nylon

bag technique, were estimated from single point incubations, and were likely contaminated by microbial protein. The study of changes in AA composition of protein sources after rumen fermentation in vivo is difficult, because other factors (feed intake, rumen outflow rates, etc.) may also affect the dietary AA supply to the small intestine, and only few data are available (Titgemeyer et al., 1989). The use of in vitro simulation systems may allow the study of the true effects of microbial fermentation on the AA composition of protein supplements under conditions where type of diet, intake, dilution rates and pH are carefully controlled.

The objective of this study was to determine the effects of diets formulated to contain increasing amounts of heat-treated soybean meal (**HSBM**) or corn gluten meal (**CGM**) on microbial fermentation, nutrient flow and relative ruminal escape of dietary AA in a dual flow continuous culture system.

3- Materials and methods

3.1- Diets and treatments

Eight isonitrogenous diets were formulated to meet or exceed NRC (2001) nutrient recommendations for lactating dairy cows producing 40 kg/d of milk (Table 1). All diets were composed of basal ingredients (71.2% of total DM) plus a treatment (28.8% of total DM). Treatments consisted of a mix of non-protein N (urea and tryptone) and a true protein supplement (HSBM or CGM) in the following proportions: 0% HSBM (**HSBM-0**), 33% HSBM (**HSBM-33**), 66% HSBM (**HSBM-66**), 100%

HSBM (**HSBM-100**), 0% CGM (**CGM-0**), 33% CGM (**CGM-33**), 66% CGM (**CGM-66**) and 100% CGM (**CGM-100**). Starch, limestone and wheat straw were used to adjust for total non-structural carbohydrates, ash and fibre content. All diets were ground at 1.5 mm.

Diets were formulated with high CP content (22%) to ensure that: 1) rumen degradable protein would not limit microbial protein synthesis in any diet (diets contained at least 9% RDP as percentage of DM, urea was included to provide excess ammonia N (**NH₃-N**), and tryptone was added to supply a source of peptides and AA); and 2) the amount of protein supplement (HSBM or CGM) would be enough to produce measurable effects on dietary AA flows. Addition of increasing levels of HSBM or CGM was designed to result in progressive increments of AA intake without altering DM intake. The basal dietary ingredients were formulated to ensure a similar microbial fermentation across treatments, and the experimental design assumed that microbial protein flow would be equal across treatments. Therefore, when AA flow was regressed on AA intake from HSBM or CGM, the changes observed in the AA flow could be attributed exclusively to the protein supplement in study.

Table 1. Ingredients and chemical composition of diets.

Item	Diet							
	HSBM-0	HSBM-33	HSBM-66	HSBM-100	CGM-0	CGM-33	CGM-66	CGM-100
Ingredients, % DM								
Basal mix ¹	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2	71.2
HSBM ²	-	9.5	19.0	28.4	-	-	-	-
CGM ³	-	-	-	-	-	7.1	14.2	21.2
Wheat straw	3.4	2.2	1.1	-	3.4	2.9	1.9	0.9
Tryptone	10.5	7.0	3.4	-	10.5	7.0	3.5	-
Urea	2.1	1.4	0.7	-	2.1	1.4	0.7	-
Starch	11.9	7.9	3.9	-	11.9	9.5	7.6	5.7
Limestone	1.0	0.9	0.8	0.4	1.0	0.9	0.9	1.1
Chemical composition, % of DM								
CP	21.7	22.0	21.8	22.1	21.7	21.8	21.9	21.8
NDF	33.8	34.7	36.9	38.8	33.8	35.1	31.9	30.9
ADF	20.2	19.9	20.6	21.4	20.2	21.0	18.9	18.4

¹Contained (g/100g of DM of the diet) alfalfa hay (19.7), corn silage (18.2), barley (16.5), wheat straw (15.2), vitamin-mineral premix (0.70), tryptone (0.55), salt (0.37).

²HSBM = Heat-treated soybean meal.

³CGM = Corn gluten meal.

3.2- Continuous culture system

Eight 1320-ml dual flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in three replicated periods of eight days each. Fermenters were inoculated with rumen fluid strained through two layers of cheesecloth taken from a ruminally cannulated cow fed a 60 to 40 forage to concentrate diet. A total of 95 g of DM of one of the eight experimental diets was fed semicontinuously (0.66 g every 10 minutes) throughout the day to each fermenter. Temperature was maintained at 39°C and pH controlled at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH. Fermentation parameters were monitored and controlled by a computer and a programmable linear controller, and fermentation conditions were programmed with Lab View Software (FieldPoint, National Instruments, Austin, TX). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N₂ at a rate of 40 ml/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into fermenters and contained 0.4 g/L of urea to simulate recycled N. Liquid and solids dilution rates were maintained at 10 and 5%/h, respectively.

3.3- Sample collection

Each experimental period consisted of 5 d for adaptation and 3 d for sampling. During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial action. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 500-ml sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluent from the three sampling days was composited and mixed within fermenter. Subsamples were taken for total N, NH₃-N and VFA analyses. The remainder of the sample was

lyophilized and ground through a 1-mm screen. Dry samples were analyzed for DM, ash, NDF, ADF, purine bases and AA.

Solid (**SAB**) and liquid (**LAB**) associated bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period. To obtain LAB, fermenter contents were strained through two layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with saline solution (0.85% wt/vol ClNa) in a three to one saline solution to solid fraction proportion to remove residual bacteria of the liquid fraction (Olubobokun and Craig, 1990), and the filtrate was added to the LAB preparation. The filtrate was centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ to remove feed particles. The obtained supernatant was centrifuged twice at $20,000 \times g$ for 20 min to isolate LAB. After the first centrifugation, the pellet was washed with saline solution, and after the second, the pellet was washed with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. The final bacterial pellet was lyophilized.

The SAB were obtained by using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994). The fermenter solid residue was suspended in a saline solution with 0.1% methylcellulose (proportion three to one saline solution to solid fraction proportion), and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove solid attached bacteria (Minato and Suto, 1978). After the incubation, samples were refrigerated for 24 h at 4°C, and then agitated for one hour with marbles (30 2-mm and 15 4-mm diameter marbles) to dislodge loosely attached bacteria. The solid fraction was strained through two layers of cheesecloth and washed three times with saline solution. The SAB pellet was obtained by differential centrifugation as in the LAB isolation procedure. Lyophilized LAB and SAB samples were composited within

fermenters to obtain a unique bacteria sample for each fermenter, and analyzed for DM, ash, N, and purine bases. Digestion of DM, OM, NDF, ADF, and CP, and flows of total N, NAN, microbial N, and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

3.4- Chemical analyses

Effluent DM was determined by lyophilizing 300-ml aliquots in duplicate with subsequent drying at 103°C in a forced-air oven for 24 h. Dry matter content of diets and bacterial samples was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced-air oven. Dry samples were ashed overnight at 500°C in a muffle furnace. Total N in feed, effluents and bacterial samples was determined by the Kjeldahl method as described by AOAC (1990). The NDF and ADF concentrations in feed and effluents were determined sequentially using a thermostable amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991). A 4-ml subsample of filtered fluid was acidified with 4 ml of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at 25,000 × *g* during 20 min, and the supernatant was analyzed for NH₃-N by colorimetry (Chaney and Marbach, 1962). Effluent and bacterial cells were analyzed for purine bases by HPLC using allopurinol as internal standard (Balcells et al., 1992). Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982) using 4-methylvaleric acid as internal standard and analyzed by gas chromatography (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Effluent samples (5 mg) for AA analysis were hydrolysed with 200 µl of 6 N HCl at 110°C for 24 h in sealed, evacuated tubes. Mercaptoethanol was used as a reducing agent to prevent the oxidation of methionine

residues during acid hydrolysis. Derivatization was conducted with 200 nmol per tube of dabsyl chloride at 70°C for 12 min. Amino acid analysis was performed by reversed-phase HPLC (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) according to the procedure of Vendrell and Avilés (1986). Norleucine was used as the internal standard and lysozyme as a standard protein of known AA profile to correct losses that may have occurred during the analytical process.

Ruminal escape of individual AA of HSBM and CGM were calculated as the slope of the regression line between the flow of each individual AA in the effluent (g/d) versus the supplemental AA intake (g/d). The relative ruminal escape of each AA within protein supplement was determined as the ruminal escape of each AA divided by the escape of total AA.

3.5- Statistical analyses

Microbial fermentation profile and nutrient flow data were analysed as a randomized complete block design using the general linear model (**GLM**) procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). The model accounted for the effects of type and level of protein source, and its interaction. Period was considered as a block. Differences between means were tested using a Tukey's multiple comparison test (Tukey, 1953).

Statistical analyses of ruminal escape of individual AA were performed with the GLM procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). The model included the period as block, and the amount of individual AA fed from each of the supplemental protein sources. The slope obtained from the lineal regression represented the proportion of ruminal escape for each individual AA. Relative ruminal escape values of AA within

each supplement were compared using a Tukey's multiple comparison test (Tukey, 1953).

4- Results and discussion

True digestion of DM and OM was higher for HSBM diets than for CGM ($P < 0.05$), and decreased as the level of RUP supplied by HSBM or CGM increased ($P < 0.01$) (Table 2). The reduction in OM digestion was expected due to the lower degradation of the protein fractions of HSBM and CGM compared with the extensive degradation of urea and tryptone in HSBM-0 and CGM-0 diets. Other authors also reported a decrease in OM degradation when rumen protected protein sources were used instead of highly degradable protein supplements (Garrett et al., 1987; Waltz and Stern, 1989; Cecava et al., 1990). Average NDF digestion was low, but was not affected by the type or the amount of protein supplement (Table 2). Diets were designed so that RDP would not limit the nutrient degradation potential of rumen microflora.

Concentrations of total VFA and molar proportions of acetate, propionate and butyrate were not affected by treatment (Table 3), indicating that the overall fermentation was similar among treatments. However, concentrations of branched-chain VFA tended to be higher ($P < 0.10$) in diets supplemented with CGM compared with HSBM diets (Table 3), and was attributed to the higher concentration of isovalerate in diets supplemented with CGM ($P < 0.01$). The branched-chain VFA isovalerate, 2-methylbutyrate and isobutyrate result from deamination of the branched-chain AA Leu, Ile and Val, and a reduction in protein degradation in the rumen has been associated with a decrease in the concentrations of these VFA (Blake and Stern, 1988; Waltz and Stern,

1989). The greater concentration of isovalerate observed in fermenters fed diets supplemented with CGM would be explained by a greater supply of degradable Leu in this supplement. Within each supplement, the concentration of isobutyrate and isovalerate decreased ($P < 0.01$) as the level of supplementation with HSBM or CGM increased, as expected.

The effect of treatments on N metabolism in fermenters is summarized in Table 4. Ammonia N concentration in the effluent was greatest for HSBM-0 and CGM-0, and decreased as the level of RUP supplied by both supplements increased ($P < 0.001$). Similarly, other authors observed in vivo (Windschitl and Stern, 1988) and in vitro (Koeln and Paterson, 1986; Calsamiglia et al., 1995) a reduction in ammonia N concentration when diets contained a rumen protected protein source compared with the use of RDP. Although a reduction in ammonia N concentration was expected, its concentration was always above the amount suggested to maximize microbial growth (Satter and Slyter, 1974). Ammonia N flow from fermenters followed the same pattern as ammonia N concentration (Table 4). Nonammonia N flow was least for HSBM-0 and CGM-0, and increased as levels of HSBM or CGM ($P < 0.001$) increased. In the present experiment, the increase in the NAN flow was associated to a greater dietary N flow (Table 4). Clark et al. (1992), using results of eight trials in which different sources of supplemental CP were fed, concluded that protein supplements with low ruminal degradability fed at high concentrations in the diet increased passage of NAN to the small intestine compared with feeding soybean meal (**SBM**) because of increased passage of nonammonia nonmicrobial N.

Table 2. Effect of increasing levels of heated soybean meal (HSBM) or corn gluten meal (CGM) on true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture.

Item	HSBM				CGM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
True digestibility												
DM, %	58.2 ^a	55.9 ^{ab}	52.2 ^{abc}	51.0 ^{bc}	54.7 ^{abc}	52.1 ^{abc}	52.1 ^{abc}	48.6 ^c	1.36	*	**	NS
OM, %	48.2 ^a	45.0 ^{ab}	41.2 ^{ab}	40.4 ^b	43.7 ^{ab}	40.4 ^b	41.6 ^{ab}	38.5 ^b	1.47	*	**	NS
Fibre digestibility												
NDF, %	26.5	21.6	16.5	17.4	16.5	19.0	19.5	13.7	3.96	NS	NS	NS
ADF, %	35.2	34.0	33.5	33.8	25.0	30.3	31.6	29.2	3.74	NS	NS	NS

^{abc} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (HSBM or CGM).

² Effect of the level of HSBM or CGM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 3. Volatile fatty acid concentrations in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal (HSBM) or corn gluten meal (CGM).

Item	HSBM				CGM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
Total, mM	101.1	95.8	91.6	95.0	94.5	91.8	100.2	90.3	3.65	NS	NS	NS
BCVFFA, mM ⁴	5.2 ^a	4.2 ^{ab}	3.2 ^b	3.2 ^b	4.7 ^a	4.3 ^{ab}	4.1 ^{ab}	3.9 ^{ab}	0.26	†	***	†
Individual, mol/100 mol												
Acetate	58.7	59.8	58.8	61.3	56.2	59.3	61.3	58.7	1.25	NS	NS	NS
Propionate	22.0	21.1	22.2	21.0	23.1	21.4	21.6	21.9	0.98	NS	NS	NS
Butyrate	9.8	10.5	11.2	10.6	11.0	10.4	9.2	11.3	0.60	NS	NS	NS
Isobutyrate	1.6 ^a	1.3 ^{ab}	1.1 ^b	1.0 ^b	1.6 ^a	1.3 ^{ab}	1.2 ^b	1.1 ^b	0.08	NS	***	NS
Valerate	4.4	4.2	4.3	3.8	4.7	4.3	3.8	3.8	0.20	NS	*	NS
Isovalerate	3.5 ^a	3.1 ^{abc}	2.5 ^{bc}	2.4 ^c	3.4 ^a	3.3 ^{ab}	3.0 ^{abc}	3.2 ^{ab}	0.17	**	**	†
Acetate to propionate ratio	2.7	2.8	2.7	2.9	2.4	2.8	2.9	2.7	0.17	NS	NS	NS

^{abc} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (HSBM or CGM).

² Effect of the level of HSBM or CGM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Branched-chain volatile fatty acids; includes isobutyrate and isovalerate.

† $P < 0.10$.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Changes in ammonia N concentration and flows of ammonia and NAN reflected ruminal degradation of dietary proteins, and agrees with previous reports (Titgemeyer et al., 1989; Cecava et al., 1990; Calsamiglia et al., 1995).

Degradation of dietary protein tended to be higher ($P < 0.10$) in diets supplemented with HSBM than in diets with CGM, indicating that CGM diets were more protected from microbial degradation (Table 4). This result agrees with previous observations by Blake and Stern (1988) and Calsamiglia et al. (1995), who found a trend for diets containing predominantly CGM to exhibit lower degradation in the fermenters than diets containing treated SBM. Within each supplement, there was a decrease in dietary protein degradation as the level of HSBM or CGM increased ($P < 0.001$), according to the changes observed in ammonia N concentration and flows of ammonia and nonammonia N (Table 4).

A reduction in microbial N flow to the small intestine as a result of feeding protein supplements with a low ruminal degradability compared with untreated SBM has been reported (Windschitl and Stern, 1988; Waltz and Stern, 1989; Clark et al., 1992). In the present study, microbial N flow tended to differ ($P < 0.10$) depending on the type and the level of supplement, and a significant type x level of supplemental protein interaction ($P < 0.05$) was detected (Table 4). This effect was due to a higher microbial N flow of HSBM-100 compared with HSBM-33 and CGM-100. However, all diets were formulated so that the amount of degradable protein would not limit microbial growth. Titgemeyer et al. (1989) suggested that if a significant percentage of dietary purines escaped ruminal degradation, bacterial N flows to the duodenum would be overestimated. However, McAllan and Smith (1973) demonstrated that pure nucleic acids are rapidly degraded in the rumen. Moreover, Calsamiglia et al. (1996) reported

that dietary purines from HSBM and CGM were nearly completely degraded by ruminal microbes in continuous culture, regardless of the total amount of purines in diets, and escape of feed purine nitrogen seemed to be a minor factor affecting calculations of microbial nitrogen flow.

Efficiency of microbial protein synthesis was not affected by the type of supplement, and all values were within the ranges reported by Stern and Hoover (1979) (Table 4). However, a significant effect of the level of supplemental protein ($P < 0.01$) and a type x level of supplemental protein interaction ($P < 0.01$) were detected. These effects were due to differences in the efficiency of microbial protein synthesis observed within HSBM diets. The greater efficiency of microbial protein synthesis of HSBM-66 and HSBM-100 compared with the values obtained in HSBM-0 and HSBM-33 results from an increase in bacterial N flow in relation to a lower OM digestion observed in these treatments. Coomer et al. (1993) and Keery et al. (1993) reported an increase in efficiency of bacterial CP synthesis in steers fed diets supplemented with RUP compared with steers fed diets supplemented with untreated SBM. Cecava et al. (1990) attributed changes in efficiency of bacterial protein synthesis to differences in $\text{NH}_3\text{-N}$, AA and peptides availability for microbes. However, in the present experiment, the basal mix contained tryptone as a source of readily available AA and peptides, and diets were fed semicontinuously, providing N and AA on a constant basis throughout the day.

Table 4. Nitrogen metabolism in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal (HSBM) or corn gluten meal (CGM).

Item	HSBM				CGM				SEM	Effect (<i>P</i> <)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
NH ₃ -N, mg/dl	46.3 ^a	32.7 ^b	23.7 ^c	15.6 ^d	47.6 ^a	31.9 ^b	23.2 ^c	12.5 ^d	1.13	NS	***	NS
N flow, g/d												
Total	3.91 ^b	4.01 ^{ab}	4.19 ^a	4.09 ^{ab}	4.04 ^{ab}	4.11 ^{ab}	4.07 ^{ab}	3.98 ^{ab}	0.05	NS	†	†
Ammonia	1.45 ^a	1.03 ^b	0.75 ^c	0.50 ^d	1.51 ^a	1.02 ^b	0.73 ^c	0.40 ^d	0.03	NS	***	NS
Nonammonia	2.46 ^d	2.98 ^c	3.44 ^a	3.59 ^a	2.53 ^d	3.09 ^{bc}	3.33 ^{ab}	3.58 ^a	0.05	NS	***	NS
Microbial	1.03 ^{ab}	1.00 ^b	1.23 ^{ab}	1.27 ^a	1.10 ^{ab}	1.04 ^{ab}	1.09 ^{ab}	0.99 ^b	0.05	†	†	*
Dietary	1.43 ^c	1.98 ^b	2.22 ^b	2.32 ^{ab}	1.42 ^c	2.05 ^b	2.24 ^b	2.60 ^a	0.07	†	***	NS
CP degradation, %	57.2 ^a	41.6 ^b	33.9 ^b	32.1 ^{bc}	57.2 ^a	38.7 ^b	33.4 ^b	23.3 ^c	2.02	†	***	NS
EMPS ⁴ , g of N/kg OMTD	24.1 ^b	24.9 ^b	33.9 ^a	35.2 ^a	28.5 ^{ab}	28.9 ^{ab}	29.6 ^{ab}	28.5 ^{ab}	1.58	NS	**	**

^{abcd} Means within the same row with different superscripts differ (*P* < 0.05).

¹ Effect of the type of supplement (HSBM or CGM).

² Effect of the level of HSBM or CGM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Efficiency of microbial protein synthesis, in g of bacterial N per kg of organic matter truly digested (OMTD)

† *P* < 0.10; * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01; *** *P* < 0.001.

The AA composition of the two supplemental protein sources used in this study is presented in Table 5 and were similar to those reported by others (Blake and Stern 1988; Titgemeyer et al., 1989; Calsamiglia et al., 1995).

Table 5. Amino acid composition (g/100g of total AA measured) of heated soybean meal (HSBM) and corn gluten meal (CGM).

Amino acid	HSBM	CGM
Asp	6.80	1.61
Glu	13.01	8.37
Ser	6.51	5.47
Thr	5.10	4.11
Gly	5.11	3.35
Ala	5.69	8.66
Arg	8.32	3.53
Pro	5.76	10.63
Val	6.85	7.11
Met	1.53	2.90
Ile	7.11	7.31
Leu	10.27	22.88
Phe	6.28	8.55
Lys	7.23	2.51
His	2.93	1.60
Tyr	1.52	1.41
Essential ¹	55.62	60.50
Nonessential ²	44.38	39.50
Total	100	100

¹ Includes Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

² Includes Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

Total AA flow was higher in fermenters fed CGM diets than in fermenters fed HSBM diets ($P < 0.01$), and increased in both cases ($P < 0.001$) as the level of supplemental protein increased (Table 6). The lower AA flow from HSBM-0, CGM-0 and HSBM-33 treatments reflects their greater ruminal CP degradation. Other authors

(Santos et al., 1984; Blake and Stern, 1988; Calsamiglia et al., 1995) reported that feeding low degradable protein supplements resulted in an increase in total AA flow. Addition of CGM resulted in greater increases ($P < 0.01$) in flows of essential (EAA) and nonessential AA (NEAA) compared with HSBM. Santos et al. (1984) observed an increase in dietary AA flow when CGM was used as a source of supplemental protein. Blake and Stern (1988), in a continuous culture study, also reported higher EAA and NEAA flows with diets containing CGM than with diets supplemented with extruded whole soybeans. Individual AA flows of Ala, Glu, Leu, Phe, Pro, Ser and Tyr were higher ($P < 0.01$) and of Lys, Asp and Arg were lower ($P < 0.05$) for diets containing CGM compared with HSBM diets. Blake and Stern (1988) reported similar differences when comparing diets containing CGM or SBM. Flows of Lys were highest for HSBM-100 and HSBM-66 treatments. Flows of Met increased with the incorporation of CGM or HSBM in diets ($P < 0.001$), and although there was a trend for a higher Met flow in CGM diets ($P = 0.09$), differences in Met supply were not significant between CGM and HSBM treatments. Similarly, Calsamiglia et al. (1995) found that fermenters fed with diets containing lignosulfonate-treated SBM had higher flows of Lys than fermenters receiving CGM supplemented diets, but differences in Met flows between both treatments were not significant. These results suggest that, although CGM provided large amounts of total AA, some potential limitations (low Lys) should be considered, and feeding combinations of protein supplements could improve the AA profile reaching the duodenum (Titgemeyer et al., 1989; Cecava et al., 1990; Calsamiglia et al., 1995). It also suggests that in spite of the higher supply of Met in CGM diets, flow was similar to HSBM probably due to its extensive degradation.

Table 6. Amino acid flow (g/d) from continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of heated soybean meal (HSBM) or corn gluten meal (CGM).

Amino acid	HSBM				CGM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
Asp	1.53 ^c	1.91 ^{bc}	2.44 ^{ab}	2.71 ^a	1.53 ^c	1.99 ^{bc}	1.96 ^{bc}	2.18 ^{ab}	0.120	*	***	*
Glu	1.97 ^d	2.37 ^{cd}	3.15 ^{bc}	3.50 ^b	1.97 ^d	3.47 ^b	3.59 ^b	4.66 ^a	0.181	***	***	*
Ser	0.75 ^d	0.89 ^{cd}	1.15 ^b	1.27 ^{ab}	0.75 ^d	1.13 ^{bc}	1.20 ^{ab}	1.43 ^a	0.050	**	***	NS
Thr	0.77 ^c	0.89 ^{bc}	1.12 ^a	1.20 ^a	0.77 ^c	1.05 ^{ab}	1.07 ^{ab}	1.18 ^a	0.037	NS	***	†
Gly	0.75 ^d	0.90 ^{cd}	1.12 ^{ab}	1.20 ^a	0.75 ^d	0.98 ^{bc}	0.98 ^{bc}	1.07 ^{abc}	0.044	NS	***	†
Ala	1.20 ^d	1.43 ^{cd}	1.55 ^{bcd}	1.69 ^{bc}	1.20 ^d	1.93 ^b	1.97 ^b	2.60 ^a	0.093	***	***	**
Arg	0.65 ^d	0.89 ^c	1.18 ^{ab}	1.25 ^a	0.65 ^d	0.88 ^c	0.89 ^c	0.99 ^{bc}	0.041	***	***	**
Pro	0.71 ^c	0.80 ^c	0.95 ^{bc}	1.04 ^{bc}	0.71 ^c	1.25 ^b	1.30 ^b	1.70 ^a	0.073	***	***	**
Val	0.91 ^c	1.03 ^c	1.34 ^{ab}	1.44 ^{ab}	0.91 ^c	1.26 ^b	1.27 ^b	1.50 ^a	0.044	NS	***	*
Met	0.25 ^b	0.30 ^{ab}	0.37 ^{ab}	0.40 ^a	0.25 ^b	0.40 ^a	0.40 ^a	0.41 ^a	0.027	†	***	NS
Ile	0.75 ^d	0.88 ^{cd}	1.21 ^{ab}	1.31 ^{ab}	0.75 ^d	1.09 ^{bc}	1.10 ^{bc}	1.34 ^a	0.048	NS	***	*
Leu	1.14 ^e	1.33 ^{de}	1.75 ^{cde}	1.91 ^{bcd}	1.14 ^e	2.30 ^{bc}	2.47 ^b	3.40 ^a	0.138	***	***	***
Phe	0.62 ^d	0.77 ^{cd}	1.01 ^{bc}	1.12 ^{ab}	0.62 ^d	1.05 ^b	1.08 ^{ab}	1.35 ^a	0.056	**	***	†
Lys	0.78 ^b	0.88 ^b	1.15 ^a	1.18 ^a	0.78 ^b	0.93 ^b	0.85 ^b	0.83 ^b	0.032	***	***	***
His	0.20 ^d	0.26 ^{cd}	0.39 ^{ab}	0.39 ^{ab}	0.20 ^d	0.33 ^{abc}	0.32 ^{bc}	0.41 ^a	0.016	NS	***	*
Tyr	0.57 ^d	0.67 ^{cd}	0.89 ^{bc}	0.87 ^{bc}	0.57 ^d	0.95 ^b	0.96 ^b	1.24 ^a	0.044	***	***	**
Essential ⁴	6.06 ^c	7.24 ^c	9.51 ^b	10.21 ^{ab}	6.06 ^c	9.28 ^b	9.44 ^b	11.40 ^a	0.369	**	***	*
Nonessential ⁵	7.48 ^d	8.97 ^{cd}	11.26 ^{bc}	12.29 ^{ab}	7.48 ^d	11.70 ^b	11.96 ^b	14.88 ^a	0.526	**	***	*
Total	13.54 ^c	16.21 ^c	20.77 ^b	22.49 ^{ab}	13.54 ^c	20.98 ^b	21.40 ^b	26.28 ^a	0.873	**	***	*

^{abcde} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (HSBM or CGM).

² Effect of the level of HSBM or CGM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Includes Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

⁵ Includes Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Relative ruminal escape of the AA from HSBM and CGM are shown in Table 7. Values less than 1 indicate that the AA was degraded more extensively than the total AA fraction; values greater than 1 indicate that the AA was degraded less extensively than the total AA supplied by the supplement. In general, NEAA were less extensively degraded and EAA more extensively degraded than total AA, although differences were not significant. Stern et al. (1983) reported in an *in vivo* study with cannulated cows that the six most degradable AA in CGM were EAA.

Degradation of individual EAA was not significantly different from total AA degradation within supplements except for Lys in CGM that was the most extensively degraded AA. This result agrees with previous reports conducted *in vivo* with cannulated cows (Stern et al., 1983; King et al. 1990), *in situ* (O'Mara et al., 1997; Erasmus et al., 1994) or *in vitro* (Blake and Stern, 1988) that observed that Lys was one of the most degradable AA among the EAA. Conversely, Titgemeyer et al. (1989) obtained a relative ruminal escape value for Lys in CGM greater than 1, indicating that Lys was less extensively degraded than the total AA pool. Titgemeyer et al. (1989) suggested that these differences may be explained by an increased Maillard product formation during processing that protected Lys from ruminal degradation.

Methionine was numerically more resistant to degradation than total AA in HSBM, and numerically more extensively degraded than total AA in CGM, although these differences did not reach significance. Some reports have shown Met to have higher degradability than total AA in several feeds (Blake and Stern, 1988; Susmel et al., 1989; Titgemeyer et al., 1989). However, data from other authors (Crooker et al., 1987;

Erasmus et al., 1994) have shown the degradation of Met to be dependent on the feedstuff.

Table 7. Relative ruminal escape of amino acids from heated soybean meal (HSBM) and corn gluten meal (CGM).

Amino acid	HSBM	CGM
Essential	0.85 ^c	0.69 ^{cde}
Arg	0.81 ^c	0.76 ^{cde}
His	0.75 ^c	0.96 ^{cd}
Ile	0.90 ^c	0.63 ^{de}
Leu	0.86 ^c	0.79 ^{cde}
Lys	0.65 ^c	0.08 ^e
Met	1.12 ^c	0.45 ^{de}
Phe	0.88 ^c	0.67 ^{cde}
Thr	0.96 ^c	0.80 ^{cde}
Val	0.89 ^c	0.65 ^{cde}
Nonessential	1.19 ^{bc}	1.47 ^c
Ala	0.91 ^c	1.26 ^{cd}
Asp	1.88 ^{ab}	3.07 ^{ab}
Glu	1.31 ^{bc}	2.54 ^b
Gly	0.97 ^c	0.72 ^{cde}
Pro	0.63 ^c	0.73 ^{cde}
Ser	0.88 ^c	0.99 ^{cd}
Tyr	2.43 ^a	3.71 ^a
Total AA	1.00 ^c	1.00 ^{cd}
SEM	0.14	0.16

^{abcde} Means within the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Degradation of branched-chain AA (Leu, Ile, Val) was not significantly different from total AA degradation in HSBM and CGM, although some authors (Titgemeyer et al., 1989; Erasmus et al., 1994) found these AA to be more resistant to degradation in the rumen.

Among the NEAA, Tyr and Asp were more resistant ($P < 0.05$) to degradation than the mean of total AA for HSBM and CGM. The Glu was also less degraded in both

supplements, although the difference in HSBM compared with total AA degradability was not significant. Chalupa (1976) found in an in vitro system that Tyr was degraded to a lesser extent when the fermentation system contained NEAA and EAA mixtures, and suggested that Tyr could be a degradative intermediate of Phe, therefore increasing the pool size of Tyr. Crooker et al. (1987) reported that the proportion of Tyr increased or tended to increase as a result of ruminal exposure in 5 out of the 7 feeds tested in situ. Titgemeyer et al. (1989) indicated that rumen degradability of Tyr appears to be protein source-dependent, because it was degraded less than total AA in SBM and fish meal, but slightly more than total AA in CGM and blood meal. The lower ruminal degradation of Asp after in situ ruminal exposure of several supplements has been reported previously (Susmel et al., 1989; Piepenbrink and Schingoethe, 1998).

Rulquin and Vérité (1993) stated that the modifications produced by rumen fermentation on dietary AA profile could vary broadly according to feedstuffs, level and degradability of the protein or methodological differences (duration of incubation, microbial contamination, etc.). However, due to methodological limitations and the small number of available data, these authors suggested the use of feed AA profiles as a first guide to estimate undegraded protein AA profiles. In our study, the high variability observed in the relative ruminal escape of individual AA from HSBM and CGM did not allowed to establish more significant differences. The carefully designed experiment, and the use of norleucine as internal standard and lysozyme as a reference protein to improve the accuracy of AA analyses, was not able to reduce this variation. Thus, seems to be extremely difficult to establish more precise values of ruminal degradation of individual AA.

5- Conclusions

Supplementation of diets with increasing levels of HSBM or CGM reduced DM and OM digestion without affecting fibre digestion, total VFA concentrations and molar proportions of acetate, propionate and butyrate. The inclusion of these low degradable protein sources also increased the flow of dietary N and AA, without having major negative effects on microbial N flows. Diets with CGM provided the largest amount of total AA, EAA and NEAA, but the low content and the high degradability of Lys should be considered when incorporated to rations as the only protein supplement.

Results from this study suggest that the individual AA of a protein supplement differ in their resistance to ruminal fermentation and microbial attack, although the establishment of accurate values of ruminal degradation is difficult. Thus, the use of the original AA profile of feed proteins to predict AA available for absorption must be taken with caution.

6- Acknowledgments

This research was supported by the project AGF97/0444 of the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología of the Spanish Government.

CAPÍTULO 3

Experimento 2:

**Rumen microbial degradation of amino acids from fish meal and blood meal in
continuous culture**

1- Abstract

Eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in three 8-d replicated periods to study the effects of diets containing increasing levels of fish meal (FM) or blood meal (BM) on microbial fermentation, nutrient flow and relative ruminal escape of dietary amino acids (AA). Fermenters were fed isonitrogenous diets composed of a basal mix (70.6% of total dry matter, DM) and a protein supplement (29.4% of total DM). The protein supplement contained 0, 33, 66 or 100% of FM or BM, and a non-protein N source (urea and tryptone). The inclusion of increasing levels of FM or BM to diets did not affect dry, organic matter and fiber digestion, total volatile fatty acid (VFA) concentrations and molar proportions of individual VFA. Ammonia N concentration and protein degradation decreased, and the flow of dietary N and AA increased with the increase of FM or BM, without affecting microbial N flow and efficiency of microbial protein synthesis. Diets supplemented with BM provided the highest flows of essential AA and Lys, and those with FM provided the highest flows of Met. Relative ruminal escape of AA indicated that Ile was the most extensively degraded AA in BM, and Asp, Glu and Tyr were the most resistant AA in both protein sources. Results suggest that the resistance to rumen degradation of individual AA within a protein supplement differs, and the use of the feed AA profile may lead to inaccurate estimates of the supply of individual AA to the small intestine.

(Key words: protein supplement, amino acid, ruminal degradation)

Abbreviation key: **BM** = blood meal, **BM-0**, **BM-33**, **BM-66**, **BM-100** = diets containing 0, 33, 66 or 100% over supplemental protein of blood meal respectively, **EAA** = essential amino acids, **FM** = fish meal, **FM-0**, **FM-33**, **FM-66**, **FM-100** = diets containing 0, 33, 66 or 100% over supplemental protein of fish meal respectively, **LAB** = liquid associated bacteria, **NEAA** = nonessential amino acids, **SAB** = solid associated bacteria.

2- Introduction

Microbial protein is the main source of AA to ruminants. As milk production per cow increases, the contribution of microbial protein to total AA reaching the small intestine is insufficient to meet the needs of the cow, and the amount of dietary AA that reaches the small intestine should increase (NRC, 2001). Microbial protein is considered to be a high quality source of absorbable AA, with an excellent profile of essential AA (**EAA**) that is fairly constant (Schwab, 1996). In contrast, there are large differences in the contribution of the undegraded dietary protein to the supply of EAA to the small intestine (Schwab, 1996). Therefore, as the partial contribution of dietary protein increases, the AA profile of the protein flowing to the small intestine may become more unbalanced. To improve the ability of feeding systems to predict the flow of AA to the small intestine, more attention should be provided to the prediction of the profile of undegraded AA of dietary origin. Feeding systems use the AA profile of the feed to estimate the flow of RUP AA to the small intestine (Rulquin and Vérité, 1993; NRC, 2001). However, the AA content of the RUP fraction could differ from the AA content

of the original feed consumed by the cow (Crooker et al., 1987; Susmel et al., 1989; Erasmus et al., 1994), and may lead to inaccurate estimates of the supply of AA to the small intestine.

In vivo estimates of AA degradation are labor intensive, time consuming and subject to considerable sources of variation. The use of in vitro simulation systems offers an alternative that allows the study of the effects of microbial fermentation on AA composition of protein supplements under controlled conditions, and considering the potential interactions that occur on rumen fermentation.

The objective of this study was to determine the effects of diets formulated to contain increasing amounts of fish meal (**FM**) or blood meal (**BM**) on microbial fermentation, nutrient flow and relative ruminal escape values of dietary AA in a dual flow continuous culture system.

3- Materials and methods

3.1- Diets and treatments

Eight isonitrogenous diets were formulated to meet or exceed NRC (2001) nutrient recommendations for lactating dairy cows producing 40 kg/d of milk (Table 1). All diets were composed of basal ingredients (70.6% of total DM) plus a treatment (29.4% of total DM). Treatments consisted in a mix of non-protein N (urea and tryptone) and a true protein supplement (FM or BM) in the following proportions: 0% FM (**FM-0**), 33% FM (**FM-33**), 66% FM (**FM-66**), 100% FM (**FM-100**), 0% BM (**BM-0**), 33% BM (**BM-33**), 66% BM (**BM-66**) and 100% BM (**BM-100**). Fish meal was defatted by

hexane extraction to prevent detrimental effects of fish oils on microbial fermentation (Calsamiglia et al., 1992). Starch, limestone and wheat straw were used to adjust for total non-structural carbohydrates, ash and fiber content. All diets were ground at 1.5 mm.

Diets were formulated with high CP content (22%) to ensure that: 1) rumen degradable protein would not limit microbial protein synthesis in any diet (diets contained at least 9% RDP as percentage of DM, urea was included to provide excess ammonia N ($\text{NH}_3\text{-N}$), and tryptone was added to supply a source of peptides and AA); and 2) that the amount of protein supplemented (from FM or BM) would be enough to produce measurable effects on dietary AA flow. Addition of increasing levels of FM or BM was designed to result in progressive increments of AA intake from the protein supplement without altering DM or CP intake. The experimental design used assumed that microbial protein flow was equal across treatments, thus all diets were formulated such that microbial fermentation would not be altered. Therefore, when the AA flow was regressed on AA intake from FM or BM, the changes observed in the AA flow could be attributed exclusively to the protein supplement in study.

Table 1. Ingredients and chemical composition of diets.

Item	Diet							
	FM-0	FM-33	FM-66	FM-100	BM-0	BM-33	BM-66	BM-100
Ingredients, % DM								
Basal mix ¹	70.6	70.6	70.6	70.6	70.6	70.6	70.6	70.6
FM ²	-	6.8	13.4	20.0	-	-	-	-
BM ³	-	-	-	-	-	4.7	9.3	14.0
Wheat straw	3.6	3.2	3.1	3.0	3.6	3.3	3.3	3.2
Tryptone	10.7	10.1	5.1	-	10.7	7.9	3.9	-
Urea	2.1	0.3	0.1	-	2.1	1.0	0.5	-
Starch	11.8	5.7	5.6	5.5	11.8	10.7	10.7	10.7
Limestone	1.1	3.3	2.1	0.9	1.1	1.8	1.7	1.5
Chemical composition, % of DM								
CP	22.0	21.9	22.0	21.9	22.0	22.0	21.9	22.1
NDF	34.3	35.2	35.1	34.0	34.3	35.0	37.8	36.2
ADF	21.0	22.0	21.8	20.4	21.0	21.0	23.0	21.3

¹Contained (g/100g of DM of the diet) alfalfa hay (19.6), corn silage (18.1), barley (16.4), wheat straw (15.1), vitamin-mineral premix (0.54), tryptone (0.54), salt (0.35).

²FM = Fish meal.

³BM = Blood meal.

3.2- Continuous culture system

Eight 1320 mL dual flow continuous culture fermenters (Hoover et al., 1976) were used in three replicated periods of eight days each. Fermenters were inoculated with rumen fluid strained through two layers of cheesecloth taken from a ruminally cannulated cow fed a 60 to 40 forage to concentrate diet. A total of 95 g of DM of one of the eight experimental diets was fed semicontinuously (0.66 g every 10 minutes) throughout the day to each fermenter. Temperature was maintained at 39°C and pH controlled at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH. Fermentation parameters were monitored and controlled by a computer and a programmable linear controller, and fermentation conditions were programmed with Lab View Software (FieldPoint, National Instruments, Austin, TX). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N₂ at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into fermenters and contained 0.4 g/L of urea to simulate recycled N. Liquid and solids dilution rates were maintained at 10 and 5%/h, respectively.

3.3- Sample collection

Each experimental period consisted of 5 d for adaptation and 3 d for sampling. During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial action. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 500-ml sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluent from the three sampling days was composited and mixed within fermenter. Subsamples were taken for total N, N-NH₃ and VFA analyses. The remainder of the sample was

lyophilized and ground through a 1-mm screen. Dry samples were analyzed for DM, ash, NDF, ADF, purine bases and AA.

Solid (**SAB**) and liquid (**LAB**) associated bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period. To obtain LAB, fermenter contents were strained through two layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with saline solution (0.85 % wt/vol ClNa) in a three to one saline solution to solid fraction proportion to remove residual bacteria of the liquid fraction (Olubobokun and Craig, 1990), and the filtrate was added to LAB preparation. The filtrate was centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ to remove feed particles. The supernatant was centrifuged twice at $20,000 \times g$ for 20 min to isolate LAB. After the first centrifugation, the pellet was washed with saline solution, and after the second, the pellet was washed with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. The final bacterial pellet was lyophilized.

The SAB were obtained by using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994). The fermenter solid residue was suspended in a saline solution with 0.1% methylcellulose (proportion three to one saline solution to solid fraction proportion), and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove solid attached bacteria (Minato and Suto, 1978). After the incubation, samples were refrigerated for 24 h at 4°C , and then agitated for one hour with marbles (30 2-mm and 15 4-mm diameter marbles) to dislodge loosely attached bacteria. The solid fraction was strained through two layers of cheesecloth and washed three times with saline solution. The SAB pellet was obtained by differential centrifugation as in the LAB isolation procedure. Lyophilized LAB and SAB samples were composited within fermenters to obtain a unique bacteria sample for each fermenter, and analyzed for DM,

ash, N, and purine bases. Digestion of DM, OM, NDF, ADF, and CP, and flows of total N, NAN, microbial N, and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

3.4- Chemical analyses

Effluent DM was determined by lyophilizing 300-ml aliquots in duplicate with subsequent drying at 103°C in a forced-air oven for 24 h. Dry matter content of diets and bacterial samples was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced-air oven. Dry samples were ashed overnight at 550°C in a muffle furnace. Total N in feed, effluents and bacterial samples was determined by the Kjeldahl method as described by AOAC (1990) procedures. The NDF and ADF concentrations in feed and effluents were determined sequentially using a thermostable amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991). A 4-ml subsample of filtered fluid was acidified with 4 ml of 0.2 N HCl and frozen. Samples were centrifuged at $25,000 \times g$ during 20 min, and the supernatant was analyzed for ammonia N (Chaney and Marbach, 1962). Effluent and bacterial cells were analyzed for purine bases by HPLC using allopurinol as internal standard (Balcells et al., 1992). Samples for VFA were prepared as described by Jouany (1982) using 4-methylvaleric acid as internal standard and analyzed by gas chromatography (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Effluent samples (5 mg) for AA analysis were hydrolysed with 200 μ L of 6 N HCl at 110°C for 24 h in sealed, evacuated tubes. Mercaptoethanol was used as a reducing agent to prevent the oxidation of methionine residues during acid hydrolysis. Derivatization was conducted with 200 nmol per tube of dabsyl chloride at

70°C for 12 min. Amino acid analysis was performed by reversed-phase HPLC (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), according to the procedure of Vendrell and Avilés (1986). Norleucine was used as the internal standard and lysozyme as a standard protein of known AA profile to correct losses that may have occurred during the analytical process.

Ruminal escape of individual AA of FM and BM were calculated as the slope of the regression line between the flow of each individual AA in the effluent (g/d) versus the supplemental AA intake (g/d). The relative ruminal escape of each AA within protein supplement was determined as the ruminal escape of each AA, divided by the escape of total AA.

3.5- Statistical analyses

Microbial fermentation profile, nutrient flow data and relative ruminal escape of AA within each protein supplement were analysed as a randomized complete block design using the general linear model (GLM) procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). The model accounted for the effects of type and level of protein source, and its interaction. Period was considered as a block. Differences between means were tested using a Tukey's multiple comparison test (Tukey, 1953).

4- Results and discussion

The true digestion of DM, OM, and fiber was not affected by the inclusion of increasing levels of FM or BM (Table 2). Although a lower DM and OM digestion as a result of feeding low degradable protein sources was expected (Waltz and Stern, 1989; Cecava et al., 1990; Gargallo et al., 2002) these differences have not always been significant (Calsamiglia et al., 1995).

Concentrations of total VFA and branch-chained VFA (BCVFA), and molar proportions of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate and isovalerate were not affected by the type of supplement or level of inclusion (Table 3). Lack of differences for total VFA concentrations and molar proportions of VFA in conjunction with similar ruminal digestion of DM, OM and fiber among treatments suggests that the supplementation of FM or BM had small effects on the ruminal fermentation process. Because BCVFA derive from the degradation of branch-chained AA, a decreased CP degradation detected as the level of RUP source increases, may be related with a decreased proportion of BCVFA (Blake and Stern, 1988; Waltz and Stern, 1989; Gargallo et al., 2002), but this did not happen in the current trial.

Table 2. Effect of increasing levels of fish meal (FM) or blood meal (BM) on true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture.

Item	FM				BM				SEM	Effect (<i>P</i> <)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
True digestibility												
DM, %	56.3	52.1	56.0	46.8	57.7	51.0	48.5	47.0	2.36	NS	NS	NS
OM, %	45.6	42.6	47.4	39.2	47.4	41.0	37.5	37.5	2.31	NS	NS	NS
Fiber digestibility												
NDF, %	19.2	23.8	27.0	20.6	23.4	21.1	22.6	25.0	2.22	NS	NS	NS
ADF, %	27.6	33.1	35.5	29.7	31.2	29.0	30.1	31.3	2.87	NS	NS	NS

¹ Effect of the type of supplement (FM or BM).

² Effect of the level of FM or BM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

Table 3. Volatile fatty acid concentrations in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal (FM) or blood meal (BM).

Item	FM				BM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
Total, mM	84.0	84.2	77.9	80.5	80.0	89.4	82.2	78.5	3.02	NS	NS	NS
BCVFA, mM ⁴	2.9	3.0	2.6	2.3	2.9	2.7	2.2	2.3	0.17	NS	NS	NS
Individual, mol/100 mol												
Acetate	53.9	53.8	54.4	57.6	55.5	56.7	59.5	56.7	1.18	NS	NS	NS
Propionate	23.5	23.3	24.3	22.2	22.4	23.2	21.1	23.7	0.92	NS	NS	NS
Butyrate	14.2	13.8	13.3	12.9	13.3	13.0	12.9	12.7	0.68	NS	NS	NS
Isobutyrate	1.2	1.3	1.1	0.8	1.2	1.0	0.9	0.9	0.09	NS	NS	NS
Valerate	4.9 ^{ab}	5.4 ^a	4.8 ^{ab}	4.3 ^{bc}	5.1 ^{ab}	4.1 ^{bc}	3.7 ^c	3.8 ^{bc}	0.23	**	**	*
Isovalerate	2.3	2.3	2.3	2.1	2.5	2.1	1.8	2.14	0.18	NS	NS	NS
Acetate to propionate ratio	2.3	2.3	2.2	2.6	2.5	2.5	2.8	2.4	0.13	NS	NS	NS

^{abc} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (FM or BM).

² Effect of the level of FM or BM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Branch-chained volatile fatty acids; includes isobutyrate and isovalerate.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Nitrogen partitioning data are presented in Table 4. Ammonia N concentration was greatest for FM-0 and BM-0, and decreased with the inclusion of increasing levels of FM or BM ($P < 0.001$). A reduction in $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration has been frequently observed when feeding low degradable protein sources compared with the use of rumen degradable proteins (Cunningham et al., 1994; Calsamiglia et al., 1995; Gargallo et al., 2002). The $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration for BM-100 treatment was 3.05 mg/dl, which was below the 5 mg/dl suggested as a minimum for optimal bacterial growth (Satter and Slyter, 1974). However, microbial N flowing out of fermenters did not decrease with the highest inclusion of supplemental FM or BM (Table 4) because all diets were formulated not to limit microbial growth. Moreover, the artificial saliva infused into fermenters contained 0.4 g/L of urea to provide additional available N for microbes.

Ammonia N flow from fermenters followed the same pattern as $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration, decreasing as the level of FM or BM increased ($P < 0.001$). Nonammonia N increased with the inclusion of FM or BM in diets ($P < 0.001$) due to the increase in dietary N flow as the level of FM or BM included in diets increased (Table 4). Increased dietary N flow has often been reported in response to high concentrations of protein supplements with low ruminal degradability, compared with feeding more degradable protein sources (Clark et al., 1992; Calsamiglia et al., 1995; Gargallo et al., 2002). The increases in dietary N flow as the level of FM or BM increased are consistent with the estimated higher dietary RUP of these protein sources.

Bacterial N flow and efficiency of microbial protein synthesis were not affected by the type or level of supplemental protein included in diets ($P > 0.05$). Efficiency of microbial protein synthesis ranged from 19.0 to 25.9 g of N/kg of OM truly digested

(Table 4), and was within the ranges reported by Stern and Hoover (1979). These results suggest that availability of $\text{NH}_3\text{-N}$, AA and peptides did not limit microbial growth. Organic matter and fiber digestibilities, VFA concentrations, and efficiency of microbial protein synthesis indicate that fermentation was similar among treatments, and was expected from the carefully formulated diets.

Dietary protein degradation was not affected by the type of supplement ($P > 0.05$), but decreased as the level of supplemental FM or BM increased ($P < 0.001$), in agreement with the changes observed in ammonia N concentration and flows of ammonia and NAN (Table 4). These results are consistent with previous *in vivo* (Titgemeyer et al., 1989; Cecava et al., 1990) and *in vitro* (Calsamiglia et al., 1995; Gargallo et al., 2002) reports.

Table 4. Nitrogen metabolism in continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal (FM) or blood meal (BM).

Item	FM				BM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
NH ₃ -N, mg/dl	53.1 ^a	33.1 ^b	28.5 ^{cd}	27.0 ^d	53.5 ^a	31.7 ^{bc}	21.0 ^e	3.05 ^f	0.92	***	***	***
N flow, g/d												
Total	4.17	3.93	3.81	4.03	4.13	3.92	3.81	3.66	0.12	NS	†	NS
Ammonia	1.67 ^a	1.04 ^b	0.90 ^{bc}	0.85 ^c	1.69 ^a	1.01 ^b	0.66 ^d	0.10 ^e	0.03	***	***	***
Nonammonia	2.50 ^c	2.90 ^{bc}	2.90 ^{bc}	3.17 ^{ab}	2.44 ^c	2.92 ^{abc}	3.15 ^{abc}	3.56 ^a	0.13	NS	***	NS
Microbial	0.92	0.82	0.78	0.79	0.90	0.75	0.82	0.87	0.06	NS	NS	NS
Dietary	1.58 ^b	2.08 ^{ab}	2.12 ^{ab}	2.38 ^a	1.55 ^b	2.17 ^{ab}	2.33 ^a	2.70 ^a	0.13	NS	***	NS
CP degradation, %	53.4 ^a	39.4 ^{ab}	38.5 ^{ab}	30.6 ^{bc}	54.3 ^a	36.7 ^{abc}	32.2 ^{bc}	21.2 ^c	3.69	NS	***	NS
EMPS ⁴ , g of N/kg OMTD	22.6	22.0	19.0	23.0	21.3	20.6	24.5	25.9	1.60	NS	NS	NS

^{abcd} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (FM or BM).

² Effect of the level of FM or BM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Efficiency of microbial protein synthesis, in g of bacterial N per kg of organic matter truly digested (OMTD)

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

The total AA content of BM was higher than the AA content of FM (70.29% versus 38.79% of DM). The AA profile of the two supplemental protein sources (Table 5) are in general agreement with values reported by Titgemeyer et al. (1989) and Schwab (1996), with the exception of Met in BM, which was much higher. The reason for the abnormally high Met content in BM is not clear.

Table 5. Amino acid composition (g/100g of total AA measured) of fish meal (FM) and blood meal (BM).

Amino acid	FM	BM
Asp	1.85	1.24
Glu	3.99	1.22
Ser	5.37	3.64
Thr	4.90	3.13
Gly	16.49	7.86
Ala	6.80	5.08
Arg	9.26	4.74
Pro	9.42	7.42
Val	6.66	11.34
Met	4.66	11.50
Ile	5.83	0.94
Leu	8.02	14.36
Phe	4.94	13.50
Lys	9.15	7.90
His	1.95	5.75
Tyr	0.70	0.37
Essential ¹	55.37	73.16
Nonessential ²	44.63	26.84
Total	100	100

¹ Includes Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

² Includes Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

The AA flow from fermenters increased as the level of supplemented BM or FM increased ($P < 0.001$), but was not different between the two supplemental protein sources (Table 6). The higher AA flow for FM-100 and BM-100 treatments was consistent with the lower CP degradation observed for these treatments. Other authors (Santos et al., 1984; Blake and Stern, 1988; Calsamiglia et al., 1995) reported increases in total AA flow when feeding low degradable protein sources. The BM diets provided higher EAA flows than the FM diets ($P < 0.01$), but differences between supplements in the flow of nonessential AA (NEAA) were not significant. Calsamiglia et al. (1995), in a continuous culture study, reported similar results when comparing diets containing FM or BM. Individual flows of Ala, Val, Leu, Phe, Lys and His were higher ($P < 0.01$) and the flow of Glu, Met, Ile and Tyr were lower ($P < 0.05$) for BM supplemented diets compared with FM supplemented diets. Methionine and Lys are generally the two most limiting AA when lactating cows are fed conventional diets (Schwab, 1996). Flows of Met were higher for FM diets compared with BM diets ($P < 0.01$) and increased as the level of FM increased ($P < 0.01$). In contrast, Lys flow increased as the level of the two supplemental protein sources increased ($P < 0.001$) but BM was a better source of Lys compared with FM ($P < 0.001$). These results agree with previous reports in vivo (Titgemeyer et al., 1989) and in vitro (Calsamiglia et al., 1995). Santos et al. (1998) concluded that BM has a Lys to Met imbalance, and its use in combinations with protein sources with complementary AA profile may be required to provide a more balanced pattern of AA delivered to the small intestine (Titgemeyer et al., 1989; Cecava et al., 1990; Calsamiglia et al., 1995).

Table 6. Amino acid flow (g/d) from continuous culture fermenters fed diets containing increasing levels of fish meal (FM) or blood meal (BM).

Amino acid	FM				BM				SEM	Effect ($P <$)		
	0	33	66	100	0	33	66	100		S ¹	L ²	S*L ³
Asp	1.46 ^b	1.75 ^{ab}	1.86 ^{ab}	2.81 ^a	1.46 ^b	1.98 ^{ab}	2.27 ^{ab}	2.48 ^{ab}	0.229	NS	**	NS
Glu	1.72 ^b	2.09 ^b	2.19 ^b	2.79 ^a	1.72 ^b	1.98 ^b	2.12 ^b	2.23 ^b	0.104	*	***	†
Ser	0.66 ^c	0.81 ^{bc}	0.85 ^{abc}	1.19 ^a	0.66 ^c	0.84 ^{abc}	0.95 ^{abc}	1.05 ^{ab}	0.075	NS	***	NS
Thr	0.69 ^b	0.84 ^b	0.87 ^b	1.23 ^a	0.69 ^b	0.81 ^b	0.89 ^b	0.95 ^{ab}	0.059	†	***	†
Gly	0.84 ^b	1.05 ^{ab}	1.00 ^{ab}	1.46 ^a	0.84 ^b	1.01 ^{ab}	1.06 ^{ab}	1.13 ^{ab}	0.119	NS	*	NS
Ala	1.03 ^d	1.24 ^{cd}	1.24 ^{cd}	1.52 ^{abc}	1.03 ^d	1.41 ^{bc}	1.61 ^{ab}	1.80 ^a	0.067	***	***	†
Arg	0.58 ^c	0.76 ^{bc}	0.81 ^{bc}	1.13 ^a	0.56 ^c	0.73 ^{bc}	0.81 ^{bc}	0.93 ^{ab}	0.058	NS	***	NS
Pro	0.58	0.74	0.69	1.01	0.58	0.69	0.72	0.78	0.086	NS	NS	NS
Val	0.78 ^d	0.94 ^{cd}	1.00 ^{cd}	1.25 ^{bc}	0.78 ^d	1.20 ^c	1.54 ^{ab}	1.77 ^a	0.062	***	***	**
Met	0.27 ^b	0.35 ^b	0.39 ^{ab}	0.64 ^a	0.27 ^b	0.29 ^b	0.32 ^b	0.33 ^b	0.051	**	**	*
Ile	0.64 ^c	0.79 ^b	0.80 ^b	0.99 ^a	0.64 ^c	0.61 ^c	0.59 ^c	0.58 ^c	0.028	***	**	***
Leu	0.93 ^d	1.16 ^{cd}	1.25 ^{bcd}	1.59 ^b	0.93 ^d	1.58 ^{bc}	2.09 ^a	2.47 ^a	0.084	***	***	***
Phe	0.57 ^d	0.70 ^{cd}	0.73 ^{cd}	0.99 ^{abc}	0.57 ^d	0.87 ^{bcd}	1.12 ^{ab}	1.30 ^a	0.062	***	***	*
Lys	0.75 ^d	0.96 ^{cd}	1.03 ^{cd}	1.34 ^{ab}	0.75 ^d	1.09 ^{bc}	1.40 ^a	1.59 ^a	0.059	***	***	*
His	0.20 ^e	0.24 ^e	0.29 ^{de}	0.46 ^{cd}	0.20 ^e	0.55 ^c	0.81 ^b	1.01 ^a	0.036	***	***	***
Tyr	0.47 ^c	0.57 ^{bc}	0.57 ^{bc}	0.76 ^a	0.47 ^c	0.53 ^{bc}	0.56 ^{bc}	0.60 ^b	0.022	**	***	*
Essential ⁴	5.41 ^d	6.73 ^{cd}	7.18 ^{cd}	9.62 ^{ab}	5.41 ^d	7.74 ^{bc}	9.56 ^{ab}	10.91 ^a	0.446	**	***	NS
Nonessential ⁵	6.76 ^c	8.23 ^{bc}	8.40 ^{abc}	11.53 ^a	6.76 ^c	8.44 ^{abc}	9.29 ^{abc}	10.08 ^{ab}	0.649	NS	***	NS
Total	12.17 ^c	14.97 ^{bc}	15.58 ^{bc}	21.16 ^a	12.17 ^c	16.17 ^{ab}	18.85 ^{ab}	20.99 ^a	1.062	NS	***	NS

^{abcde} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Effect of the type of supplement (FM or BM).

² Effect of the level of FM or BM (0, 33, 66 or 100 % of supplemental protein).

³ Effect of the interaction of type and level of supplement.

⁴ Includes Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

⁵ Includes Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

† $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Relative ruminal escape of AA from FM and BM are presented in Table 7. A relative ruminal escape value smaller than 1 indicates that the AA were more extensively degraded than the total AA fraction within each supplement, while values greater than 1 indicate that this AA was less extensively degraded than the total AA provided by the supplement. Relative ruminal escape for EAA in both supplements were numerically less than 1, suggesting that EAA were in general more extensively degraded than the total AA pool. In contrast, NEAA were more resistant to microbial attack than the average of total AA. However, these differences were not significant.

Among the EAA, only Ile in BM presented a relative escape value significantly lower than total AA. In the review of Santos et al. (1998), Ile appears as the first limiting EAA of BM. In addition to this low content of Ile in BM, our results suggest that most of the Ile supplied by BM would be degraded by ruminal bacteria. Other authors (Maiga et al., 1996; Piepenbrink et al., 1998) reported that the concentration of Ile in BM protein was lower after ruminal exposure compared to the original feed AA profile. This is in contrast with the generally accepted observation that branch-chained AA tend to be more resistant to microbial degradation in the rumen (Crooker et al., 1987; Titgemeyer et al., 1989; Erasmus et al., 1994). Except for Ile in BM, degradation of all the other branched-chain AA (Ile in FM; Val and Leu in both supplements) was not significantly different from total AA degradation, although the relative escape for Leu in both supplements was numerically higher than total AA. Methionine was the second most degradable AA in BM, although the difference compared with total AA degradation was not significant. Similarly, Titgemeyer et al. (1989) reported that Met was the most extensively degraded EAA in BM. The relative rumen escape value of Met in FM was intermediate, although it was not significantly lower compared with total AA. Some

authors (Blake and Stern, 1988; Susmel et al., 1989; Titgemeyer et al., 1989) reported that Met was generally more extensively degraded than total AA in several feeds. However, other authors (Crooker et al., 1987; Erasmus et al., 1994) observed that the degradation of Met was feed-dependent. The relative rumen escape of Lys was higher than 1 in BM, and lower than 1 in FM, although not significantly different from total AA values. These results agree with the findings of Titgemeyer et al. (1989). Our results for relative ruminal degradation of EAA in BM suggest that, although BM provided higher EAA flows than FM, some of these EAA (Ile, Met) were highly degradable in the rumen and should be considered when supplied as a RUP source.

Among the NEAA, Asp, Glu and Tyr were less extensively degraded ($P < 0.05$) compared with the average of total AA of FM and BM (Table 7). These results agree with those obtained in a similar study carried out in our laboratory (Gargallo et al., 2002) with heat-treated soybean meal and corn gluten meal as sources of dietary AA. Other authors reported increased concentrations of these AA after ruminal exposure of FM (Crooker et al., 1987; Susmel et al., 1989; O'Mara et al., 1997) or BM (Maiga et al., 1996). Titgemeyer (1989) obtained, in an in vivo study, a protein source-dependent ruminal degradation of Tyr, being degraded less than total AA in FM and soybean meal, but slightly more degradable than total AA in BM and corn gluten meal. The most degradable NEAA in FM and BM were Gly and Pro, although its degradation was not significantly different from total AA degradation within supplements. Crooker et al. (1987), Erasmus et al. (1994) and O'Mara et al. (1997) also reported Gly to be more degradable than the average AA degradation in FM.

Table 7. Relative ruminal escape of amino acids from fish meal (FM) and blood meal (BM).

Amino acid	FM	BM
Essential	0.94 ^c	0.86 ^{cdef}
Arg	0.71 ^c	0.82 ^{cdef}
His	1.56 ^c	1.61 ^c
Ile	0.82 ^c	-0.76 ^g
Leu	1.14 ^c	1.22 ^{cde}
Lys	0.86 ^c	1.23 ^{cde}
Met	0.77 ^c	0.06 ^{fg}
Phe	0.99 ^c	0.62 ^{cdef}
Thr	1.17 ^c	0.92 ^{cdef}
Val	0.95 ^c	0.99 ^{cdef}
Nonessential	1.08 ^c	1.38 ^{cd}
Ala	0.96 ^c	1.69 ^c
Asp	6.17 ^a	9.42 ^a
Glu	3.37 ^b	4.69 ^b
Gly	0.26 ^c	0.39 ^{def}
Pro	0.31 ^c	0.29 ^{efg}
Ser	0.97 ^c	1.22 ^{cde}
Tyr	5.91 ^a	3.96 ^b
Total AA	1.00 ^c	1.00 ^{cdef}
SEM	0.25	0.20

^{abcde} Means within the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

The effects of rumen microbial fermentation on the degradation of dietary AA appear to be highly variable. In addition, the few data available and the methodological limitations, make it difficult to determine the AA profile of undegraded dietary proteins. Therefore, current feeding systems (Rulquin and Vérité, 1993; NRC, 2001) decided to use the undigested feed AA profiles as a first guide to estimate undegraded protein AA profiles. Our findings suggest, in agreement with other authors (Crooker et al, 1987; Susmel et al., 1989; Erasmus et al., 1994) that the ruminal degradation of individual AA, compared with total AA degradation, varies within feedstuffs. However, the high variability obtained in the estimated relative ruminal escape of individual AA from FM

and BM did not allow detecting more significant differences, although these differences could be biologically important. Thus, in spite of the carefully controlled fermentation conditions and the accuracy of AA analyses, the assignment of more precise values of relative ruminal escape of individual AA seems to be very difficult.

5- Conclusions

The inclusion of increasing levels of FM or BM to diets did not affect DM, OM and fiber digestion, total VFA concentrations and molar proportions of individual VFA, but increased the flows of dietary N and AA without affecting microbial N flows. Blood meal-supplemented diets provided the highest flows of EAA and Lys, although Ile and Met were highly degraded by ruminal bacteria, while FM was a good source of Met. In spite of the carefully feeding and controlled fermentation conditions, it was not possible to establish an accurate value of rumen degradation for each individual AA. However, results suggest that the resistance to rumen degradation of individual AA within a protein supplement differs. Therefore, the use of the original feed AA profiles as a guide to estimate undegraded protein AA profiles must be taken with caution.

6- Acknowledgments

This research was supported by the project AGF97/0444 of the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología of the Spanish Government.

CAPÍTULO 4

Experimento 3:

**A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of
protein and amino acids**

1- Abstract

An in vitro batch incubator (Daisy^{II}) was used to develop a technique to estimate intestinal digestion of proteins and amino acids (AA). The objective was to adapt the three step in vitro procedure (TSP) of Calsamiglia and Stern (J. Anim. Sci.1995. 73:1459-1465) to reduce the cost and labor involved in the determination of intestinal digestion of proteins, and to obtain a residue that could be analyzed for AA content. Four tests were conducted to study the effects of the type of pepsin (Sigma P-7012 vs Sigma P-7000), the type of bags used for the incubation of samples (nylon bags, Ankom R510, vs bags for fiber analysis, Ankom F57), the amount of sample per bag (0.5, 1, 2 or 5 g) and the number of bags per incubation bottle (5, 15, 20 or 30 bags) on the estimated intestinal digestion of protein. A soybean meal (SBM) sample heated at 170°C for 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 h was used in all preliminary tests to determine the optimum conditions of the technique. The intestinal digestion of 12 protein supplements was determined using the proposed Daisy^{II} and the TSP techniques. Results using the two types of pepsin were strongly correlated ($r^2 = 0.99$; $P < 0.001$). Intestinal digestion of SBM samples obtained from the TSP assay were highly correlated with those obtained using the Daisy^{II} incubator with both types of bag ($r^2 = 0.98$; $P < 0.001$). The amount of sample per bag and the number of bags per incubation bottle did not affect estimates of intestinal digestion. Intestinal digestion of the 12 protein supplements determined with TSP and with Daisy^{II} technique were highly correlated ($r^2 = 0.84$; $P < 0.001$). The AA profile of the residue of these feeds after pepsin-pancreatin digestion was different from RUP, and the lower content in essential AA (EAA) in the pepsin-pancreatin residue suggests that EAA were more digestible than non EAA (NEAA). These results indicate

that the use of up to 30 nylon bags (Ankom R510) with 5 g of sample in each Daisy^{II} incubation bottle could be used to estimate intestinal digestion of protein and AA. Results suggest that EAA are more digestible in the small intestine than NEAA.

(Key words: in vitro, intestinal digestion, protein, amino acids)

2- Introduction

Absorbed AA are the building blocks for the synthesis of tissue and milk proteins (Schwab, 1996; NRC, 2001). Microbial protein synthesized in the rumen is of a relatively constant AA profile and digestibility, and supplies 50 to 80% of absorbable AA flowing to the small intestine (Schwab, 1996). Rumen undegradable dietary protein is the second major source of AA supplied to the small intestine. However, its digestibility in the small intestine and its AA profile is highly variable depending on type of feed and processing. Recently developed protein evaluation systems have incorporated the value of intestinal digestion of protein, but assume a constant rate of intestinal digestion for individual AA within each feedstuff (O'Connor et al., 1993; NRC, 2001; Rulquin et al., 2001). Little information is available concerning the digestion of individual AA in the small intestine, which will become increasingly critical as systems that incorporate AA requirements are introduced. The intestinal availability of AA that escape rumen fermentation has been estimated in vivo (Santos et al., 1984; Titgemeyer et al., 1989), or using the mobile nylon bag technique (Cros et al., 1992ab; Erasmus et al., 1994; O'Mara et al., 1997). However, these methods are expensive, labor-intensive, and time-consuming. A three-step in vitro procedure (**TSP**) was developed by Calsamiglia and Stern (1995) to estimate intestinal digestion of proteins in

ruminants in a fast and cost-effective manner. However, this method does not allow to estimate the intestinal digestion of individual AA. The objective of this study was to modify the TSP of Calsamiglia and Stern (1995), by adapting it to a Daisy^{II} incubator, to further reduce the cost and labor involved in the determination of intestinal digestion of proteins, and to be able to estimate the intestinal digestion of individual AA.

3- Materials and methods

3.1- Modified pepsin-pancreatin digestion procedure

A soybean meal (**SBM**) sample was heated at 170°C for 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 h (**S-0, S-0.5, S-1, S-2, S-4, S-6** and **S-8**, respectively) to provide a wide range of intestinal digestibilities. These samples were used in all preliminary tests to establish the optimum conditions of the pepsin-pancreatin digestion technique. A total of four tests were conducted to study the effects of the type of pepsin, the type of bags used for the incubation of samples, the amount of sample per bag, and the number of bags per incubation bottle on the estimated intestinal digestion of these SBM samples.

3.1.1- Type of pepsin

The pepsin-pancreatin procedure of Calsamiglia and Stern (1995) uses an expensive, high enzymatic activity pepsin (Sigma P-7012, Sigma, St. Louis, MO). The Daisy^{II} requires 2 L of pepsin solution per bottle, making the technique relatively expensive. The AOAC (1990) recommends the use of a cheaper and lower enzymatic

activity pepsin (Sigma P-7000, Sigma, St. Louis, MO). A comparative study was conducted in two replicated periods to determine the effect of the type of pepsin on the intestinal digestion of the different SBM samples. In each period, the pepsin-pancreatin digestion was determined in triplicate following the procedures of Calsamiglia and Stern (1995) using the P-7012 or P-7000 pepsin. Results obtained with the use of the P-7000 pepsin were regressed on estimates obtained with the use of the P-7012 pepsin. Regression analysis was conducted using the GLM procedures of SAS (SAS Inst., Cary, NC), and the CORR procedure was used to determine the correlation between the two types of enzyme.

3.1.2- Type of bags

The pepsin-pancreatin digestion procedure (Calsamiglia and Stern, 1995) was adapted to the Daisy^{II} incubator (ANKOM, Fairport, NY) using two different types of bags to determine the intestinal digestion of the different SBM samples. Two replicated periods were conducted. In each experimental period, 0.5 g of sample were weighed into bags for fiber analysis (Ankom F57, pore size 50 μm , ANKOM, Fairport, NY) in triplicate, and the same procedure was conducted using nylon bags (10 x 5 cm, Ankom R510, pore size 50 μm , ANKOM, Fairport, NY) cutted in half, resulting in two 5 x 5 cm bags. Three empty bags of each type were used as blanks within each run. A total of 24 bags were introduced in each incubation bottle containing 2L of a 0.1 N HCl solution adjusted to pH 1.9, with 1 g/L of pepsin (Sigma P-7000, Sigma), and were incubated for 1 h in constant rotation at 39°C. After incubation, bags were rinsed with tap water and introduced in the incubation bottles (24 bags per bottle) containing 2L of a pancreatin

solution (0.5 M KH₂PO₄ buffer adjusted to pH 7.75 containing 50 ppm of thymol and 3 g/L of pancreatin (Sigma P-7545, Sigma)). Bags were incubated for 24 h in constant rotation at 39°C. After incubation, bags were rinsed with tap water until runoff was clear. The original samples and the residue in all bags were analyzed for N content by the Kjeldahl method (AOAC, 1990). Pepsin-pancreatin digestion of N was calculated as N in the original sample minus N remaining after pepsin-pancreatin incubation divided by N in the original sample. Values obtained were compared with the ones obtained for the same samples using the TSP (Calsamiglia and Stern, 1995) by regression and correlation analyses using the GLM and the CORR procedures of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC), respectively.

3.1.3- Amount of sample per bag

Samples of SBM (S-0, S-2, and S-8) were incubated in nylon bags (Ankom R510, pore size 50 µm) in the Daisy^{II} incubator to determine the effect of the amount of sample per bag on the intestinal digestion of samples with different intestinal digestibilities. Treatments were: 0.5 and 1 g of sample weighed in small (5 x 5 cm) nylon bags (**H-0.5** and **H-1**, respectively); and 1, 2 or 5 g of sample weighed in large (5 x 10 cm) nylon bags (**L-1**, **L-2** and **L-5**, respectively). The intestinal digestion of the samples was determined in triplicate by the Daisy^{II} technique in two replicated periods. Results for each treatment were compared within samples by the GLM procedure of SAS.

3.1.4- Number of samples per incubation bottle

A SBM sample of intermediate digestibility (heated at 170°C for 1h) was used for this test. Treatments consisted in the introduction of 5, 15, 20 or 30 nylon bags (Ankom R510, 5 x 10 cm) filled with 5 g of sample in each incubation bottle (**B-5**, **B-15**, **B-20** and **B-30**, respectively). The pepsin-pancreatin digestion was conducted in the Daisy^{II} incubator in two consecutive periods, following the procedure explained previously. After the incubation, 5 bags of each treatment were randomly selected to obtain the pepsin-pancreatin digestibility values. Treatments differences were compared using the GLM procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

3.2- Ruminal incubation

Calsamiglia and Stern (1995) justified the need of a ruminal incubation of the samples previous to the pepsin-pancreatin digestion. Therefore, after determining optimal conditions of the pepsin-pancreatin test, a trial was conducted to determine the effect of ruminal preincubation on pepsin-pancreatin digestion of feed protein determined by the Daisy^{II} technique. The protein supplements used for this test were: blood meal (**BM**), fish meal (**FM**), green peas, lupin seeds, whole cottonseed, corn gluten meal (**CGM**), alfalfa pellets, heat-processed SBM (**HSBM**), sunflower seeds, barley dried distillers grains (**BDDG**), corn dried distillers grains (**CDDG**), and corn gluten feed. Approximately 5 g of each protein source (ground through a 2-mm screen) were weighed into 5 x 10 cm nylon bags (Ankom R510, pore size 50 µm). Depending on N content and CP degradability of the feed tested, 25 to 33 bags per feedstuff were

suspended in the rumen of a cannulated multiparous Holstein cow. An incubation of 12 h was selected because it represents the residue that escapes ruminal degradation (Maiga et al., 1996; O'Mara et al., 1997). In addition, Calsamiglia and Stern (1995) detected no differences in pepsin-pancreatin digestion of proteins when samples were preincubated in the rumen for 12 to 18 h. After 12 h of ruminal incubation, bags were rinsed for 5 min three times in an automatic washing machine. Then, bags were suspended in a 0.1% methylcellulose solution, and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove solid attached bacteria (adapted from Whitehouse et al., 1994). Bags were stored at -18 °C until subsequent analyses. Before the pepsin-pancreatin incubation step, bags were thawed and machine-washed three times (5 min each) to remove detached bacteria. Bags were oven-dried at 55°C for 48 h. Remaining residues were composited within feedstuff. Intestinal digestion of the residual CP was determined by quadruplicate using optimal conditions of the Daisy^{II} pepsin-pancreatin procedure. Results were compared with those obtained when the same protein supplements were processed without ruminal exposure. Differences between the intestinal digestion of samples with or without ruminal exposure were analyzed by the GLM procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Statistical differences were declared at $P < 0.05$ using Tukey's test (Tukey, 1953).

3.3- Comparison of TSP and Daisy^{II} protein digestibility values

The rumen incubated residues of the same 12 protein supplements used in the previous test were processed by the TSP of Calsamiglia and Stern (1995) and results were compared to those obtained by the Daisy^{II} technique using the GLM procedure of

SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). The correlation between the two techniques was determined by the CORR procedure.

3.4- Measuring intestinal digestion of amino acids

The Daisy^{II} technique was used to study the changes in the AA profile of proteins after in situ rumen incubation and after pepsin-pancreatin digestion in a Daisy^{II} incubator. The same protein supplements used in the previous test were used. For each protein supplement a total of three types of samples were obtained for AA analysis: 1) a sample of the original supplement (**O**); 2) a sample of the residue after rumen incubation (**R**), and 3) a sample of the residue after the rumen-pepsin-pancreatin incubation (**RI**). The changes in essential AA (**EAA**) profiles after in situ rumen incubation were calculated as:

$$((R - O) / O) \times 100$$

where R is the percentage of each individual EAA (% of total AA) in rumen exposed residues, and O is the percentage of the same AA in the original supplement (**O**).

The changes in EAA profiles after pepsin-pancreatin incubation of rumen exposed samples were calculated as:

$$((RI - R) / R) \times 100$$

where RI is the percentage of each individual EAA (% of total AA) in pepsin-pancreatin incubation residues, and R is the percentage of the same AA in the rumen exposed residue.

The changes in EAA profiles of all the supplements were analyzed together to determine if a general trend could be established for all protein supplements. This analysis was performed by the MEANS procedure of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) considering the individual EAA and the process (incubation in the rumen or rumen and pepsin-pancreatin incubation) as classes, and the change in AA profile as the variable.

3.5- Chemical analyses

All the SBM samples used in the preliminary tests and all the protein supplements and its rumen and pepsin-pancreatin incubation residues obtained in the ruminal incubation test, were analyzed for DM and N content. Dry matter was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced-air oven. Nitrogen content of all samples was determined by the Kjeldahl method as described by AOAC (1990). For each protein supplement used in the application of the technique, the three types of sample obtained (O, R, and RI) were analyzed in duplicate for AA content. Cottonseed was excluded of this analysis due to the difficult to obtain homogeneous samples. A 5-mg sample was hydrolysed with 200 µl of 6 N HCl at 110°C for 24 in a sealed, evacuated tube. Mercaptoethanol was used as a reducing agent to prevent the oxidation of methionine residues during acid hydrolysis. Derivatization was conducted with 200 nmol per tube of dabsyl chloride at 70°C for 12 min. Amino acid analysis was performed by reversed-phase HPLC (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), according to the procedure of Vendrell and Avilés (1986). Norleucine was used as the internal standard and lysozyme as a standard protein of known AA profile to correct losses that may have occurred during the analytical process.

4- Results and discussion

The heat-processed SBM samples used for the development of the procedure provided a wide range of pepsin-pancreatin digestions (S-0 = 82.2%, S-0.5 = 78.5%, S-1 = 78.4%, S-2 = 57.4%, S-4 = 29.7%, S-6 = 23.9%, and S-8 = 10.7%) when using the procedure of Calsamiglia and Stern (1995).

4.1- Modified pepsin-pancreatin digestion procedure

4.1.1- Type of pepsin

Results obtained with the use of the pepsin of lower enzymatic activity were highly correlated ($P-7012 = (0.99 * P-7000) - 1.19$; $r^2 = 0.99$, $P < 0.001$, $n = 14$) to results obtained with the use of the high enzymatic activity pepsin, suggesting the pepsin P-7000 could be used in the TSP of Calsamiglia and Stern (1995) without affecting results and at a lower cost.

4.1.2- Type of bags

The results obtained with the Daisy^{II} technique using nylon bags (Ankom R510) were highly correlated ($Daisy_{R510} = (1.37 * TSP) - 15.81$; $r^2 = 0.98$, $P < 0.001$, $n = 14$) to results obtained with the TSP. A high correlation was also observed when using Ankom bags for fiber analysis (Ankom F57) ($Daisy_{F57} = (1.33 * TSP) - 15.14$; $r^2 = 0.98$,

$P < 0.001$, $n = 14$). Results suggest that the type of bag used in the Daisy^{II} technique did not affect the estimate of pepsin-pancreatin digestion of SBM samples. However, the use of the larger nylon bags (Ankom R510) allows for the preincubation in the rumen in the same bag, and the incubation of larger samples (up to 5 g) required for measuring intestinal digestion of AA.

4.1.3- Amount of sample per bag

The pepsin-pancreatin digestion of SBM protein in the Daisy^{II} was not affected by the amounts of sample per bag tested. Estimated intestinal digestion obtained with S-0 was 97.9, 97.5, 97.5, 97.3 and 97.3 %, respectively for H-0.5, H-1, L-1, L-2, and L-5 treatments. Intestinal digestion obtained with S-2 was 58.6, 59.1, 60.3, 57.3 and 56.4 %, respectively for H-0.5, H-1, L-1, L-2, and L-5 treatments; and results obtained with S-8 were 9.2, 9.0, 8.2, 9.1, and 8.3 % respectively for H-0.5, H-1, L-1, L-2, and L-5 treatments. While the use of small quantities may be adequate to estimate intestinal digestion of a protein, the use of 5 g per bag may be required to obtain enough undigested residue for AA analysis without affecting the estimated value of intestinal digestion.

4.1.4- Number of samples per incubation bottle.

The number of bags introduced per incubation bottle had no effect on the pepsin-pancreatin digestion of a heat-treated SBM sample estimated by the Daisy^{II} technique (55.6, 56.6, 55.9 and 55.9 % for B-5, B-15, B-20 and B-30 treatments, respectively).

This result suggests that the use of up to 30 bags per incubation bottle is possible when estimating the intestinal digestion of proteins by the Daisy^{II} technique.

4.2- Ruminal incubation

Pepsin-pancreatin digestion of CP remaining after 12 h of ruminal incubation was lower ($P < 0.05$) compared with digestion of samples not incubated in the rumen in all the protein supplements except for green peas and lupin seeds (Table 1). The reduction in pepsin-pancreatin digestion after ruminal preincubation of some feedstuffs has been reported previously (de Boer et al., 1987; Calsamiglia and Stern, 1995), and it can be attributed to a higher degradation of the digestible protein in the rumen, resulting in a smaller fraction of the RUP available for intestinal digestion. Results of this trial confirm that preincubation of feeds in the rumen is recommended to estimate intestinal digestion of the RUP fraction of feeds by the Daisy^{II} technique.

Table 1. Intestinal CP digestion (%) determined by the Daisy^{II} technique of original protein supplements samples (O) and of rumen preincubated samples (R).

Protein source	Type of sample		SEM	P <
	O	R		
Blood meal	69.61 ^a	45.74 ^b	1.26	***
Green peas	72.57 ^b	82.45 ^a	0.31	***
Lupin seeds	78.34 ^b	88.20 ^a	0.16	***
Whole cottonseed	84.96 ^a	35.62 ^b	0.26	***
Corn gluten meal	93.20 ^a	79.22 ^b	1.90	**
Alfalfa pellets	84.74 ^a	59.70 ^b	0.39	***
Heat-treated soybean meal	98.12 ^a	96.33 ^b	0.17	***
Sunflower seeds	93.57 ^a	82.99 ^b	0.10	***
Barley dried distillers grains	95.60 ^a	65.60 ^b	0.18	***
Corn gluten feed	89.53 ^a	70.49 ^b	0.18	***
Corn dried distillers grains	76.78 ^a	56.32 ^b	0.67	***
Fish meal	93.98 ^a	91.46 ^b	0.64	*

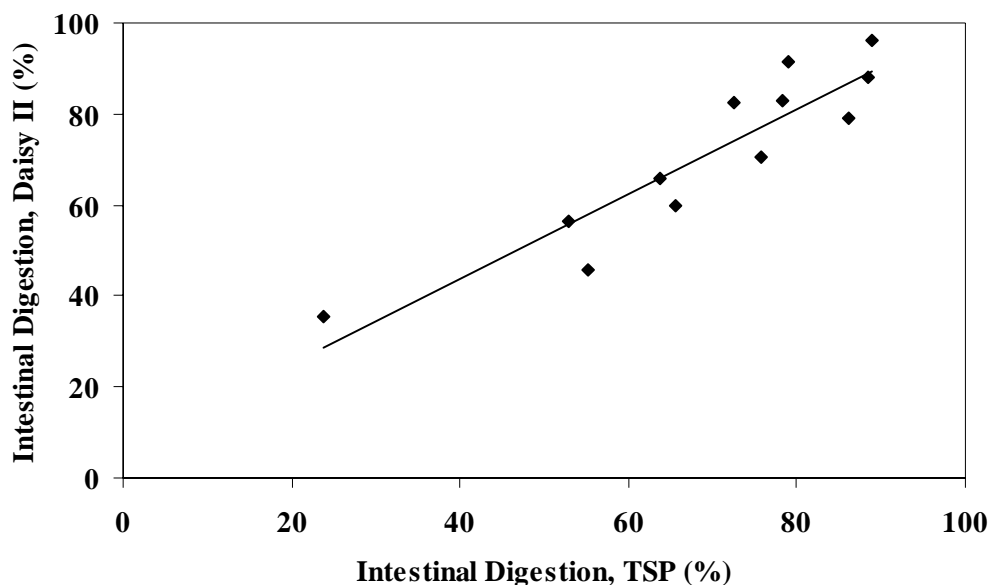
^{ab} Means within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

4.3- Comparison of TSP and Daisy^{II} protein digestibility values

Intestinal CP digestion of the 12 protein supplements determined by the Daisy^{II} technique are shown in Table 1. Average estimate of CP intestinal digestion in the Daisy^{II} (71.2 %) was similar to the TSP (69.2 %), and were highly correlated (Daisy^{II} = (0.93 *TSP) + 6.78; $r^2 = 0.84$, $P < 0.001$, $n = 12$) (Figure 1). This correlation indicates that the Daisy^{II} technique can be used to predict the intestinal digestion of proteins, reducing the cost and labor involved in the process, and allowing for the recovery of enough residues for the analysis of the AA profile.

Figure 1. Regression line showing the relationship between the intestinal digestion (%) of 12 protein supplements determined by the Daisy II technique and by the three-step procedure (TSP). (Daisy II = 0.93 * TSP + 6.78; $r^2 = 0.84$, $P < 0.001$, $n = 12$)



4.4- Protocol of the Daisy II procedure

1. Weigh approximately 5 g of feed (ground through a 2-mm screen) into 5 x 10 cm nylon bags (Ankom R510, pore size 50 μm) and suspend them in the rumen for 12 h. The number of bags required to provide enough amount of residue per feedstuff will depend on N content and CP degradability of the feed tested.
2. After ruminal incubation, rinse bags for 5 min three times in an automatic washing machine (or until runoff is clear). Then, suspend bags in a 0.1% methylcellulose solution, and incubate in a shaking water bath at 37°C for 30

min. to help in the detachment of particle associated bacteria. Rinse bags with tap water and store them at -18 °C until subsequent analyses. Before the pepsin-pancreatin incubation step, thaw and wash all bags for 5 min three times in an automatic washing machine (or until runoff is clear). Allow to drain and dry in oven at 55°C for 48 h. Pool residues from bags, composite them by feedstuff and determine N content by the Kjeldahl method (AOAC, 1990). This step is required only in low protein high fiber samples, and when the objective is the analysis of AA, because microbial protein or AA may be an important fraction of the residual protein.

3. Weigh 0.5 to 5 g of rumen exposed residue into nylon bags (Ankom R510, pore size 50 µm) and heat seal. Place up to 30 bags in each incubation bottle of a Daisy^{II} incubator (ANKOM, Fairport, NY). Add 2 L of a prewarmed, 0.1 N HCl solution at pH 1.9 containing 1 g/L of pepsin (Sigma P-7000, Sigma, St. Louis, MO) and incubate in constant rotation at 39°C for 1 h.
4. After incubation, drain all liquid and rinse bags with tap water until runoff is clear.
5. Introduce the bags in the incubation bottles (a maximum of 30 bags per bottle), and add 2 L of a prewarmed pancreatin solution (0.5 M KH₂PO₄ buffer standardized at pH 7.75 containing 50 ppm of thymol and 3 g/L of pancreatin (Sigma P-7545, Sigma, St. Louis, MO). Incubate bags for 24 h in constant rotation at 39°C.
6. After incubation, drain all liquid and rinse bags with tap water until runoff is clear.

7. Allow the bags to drain and dry in oven at 55°C for 48 h. Record dry weight. Analyze residue in all bags for N content by the Kjeldahl method (AOAC, 1990).
8. Calculate the pepsin-pancreatin digestion of protein as the amount of sample N (rumen exposed residue) minus N remaining after pepsin-pancreatin incubation divided by amount of sample N.
9. Samples may be pooled for AA analysis.

4.5- Measuring intestinal digestion of amino acids

The above protocol was used to study the changes in the AA profile of eleven protein supplements (BM, FM, green peas, lupin seeds, CGM, alfalfa pellets, HSBM, sunflower seeds, BDDG, CDDG, and corn gluten feed) after in situ rumen incubation and after pepsin-pancreatin digestion in a Daisy^{II} incubator (ANKOM, Fairport, NY). Differences between feedstuffs for individual AA disappearances could not be tested in our study, because samples obtained from four replicates had been pooled per feedstuff before analysis of AA, resulting in only one observation per AA and per feedstuff. However, these differences can be estimated by the Daisy^{II} technique if the replicates for each feedstuff remain separated for the AA analysis. This information would allow selection of proteins with high digestibilities of those AA that are most likely to limit production.

The changes in the EAA profile of feeds as a result of a 12-h in situ ruminal incubation and a pepsin-pancreatin incubation of rumen-exposed samples in a Daisy^{II} are given in Table 2. Previous reports (Susmel et al., 1989; Erasmus et al., 1994; O'Mara et al., 1997), suggested that rumen fermentation alters the AA profile of RUP compared

with the original feedstuff. We observed that in general Met was the least degraded EAA in the rumen, (as its concentration increased an average of 76 % after incubation of feeds in the rumen), and Lys was the most degraded EAA (with a mean decrease of 7 %). However, these changes were not significant, indicating that a general trend for Lys and Met can not be established for all supplements. Although Met has been considered one of the most resistant AA (Tamminga, 1979; O'Mara et al., 1997), some authors (Susmel et al., 1989; Titgemeyer et al., 1989) reported that Met was generally more extensively degraded than total AA in several feeds, and other authors (Crooker et al., 1987; Erasmus et al., 1994) observed that the degradation of Met was feed-dependent. Similarly to our study, Erasmus et al. (1994) found a decrease in Lys concentrations in the undegraded protein fraction in 9 of 12 feedstuffs, and O'Mara et al (1997) stated that Lys was one of the more degradable of the EAA. The proportion of Phe increased significantly (an average of 10 %) as a consequence of ruminal exposure (Table 2), indicating that for most of the protein supplements tested, Phe was one of the most resistant EAA. Erasmus et al. (1994) and O'Mara et al. (1997) reported similar findings for Phe. However, Titgemeyer et al. (1989) observed that ruminal degradation of Phe appeared to be protein source-dependent. The average changes for the rest of the EAA were not significant, indicating that a general trend for these EAA can not be established for all the supplements. Reasons for differences in proportions of individual AA degraded among protein sources are not known, but inherent properties of proteins and AA, and processing procedures applied to feeds must be considered as the major factors involved (Titgemeyer et al., 1989).

Table 2. Changes in the EAA profile of 11 feedstuffs after a 12-h in situ ruminal incubation (R) and after pepsin-pancreatin incubation (ID) in a Daisy^{II} (expressed as proportion of AA escaping degradation)

Amino acid	R	SEM	<i>P</i> <	ID	SEM	<i>P</i> <
Thr	1.17	0.11	NS	1.01	0.04	NS
Arg	0.95	0.04	NS	0.61	0.08	***
Val	1.00	0.04	NS	0.99	0.05	NS
Met	1.76	0.58	NS	0.99	0.14	NS
Ile	1.06	0.05	NS	0.91	0.06	NS
Leu	1.06	0.05	NS	0.97	0.06	NS
Phe	1.10	0.04	*	0.90	0.05	†
Lys	0.93	0.07	NS	0.97	0.07	NS
His	1.03	0.10	NS	1.17	0.11	NS
EAA ¹	1.03	0.03	NS	0.90	0.03	*

¹ Essential amino acids, includes Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

† *P* < 0.10 (Mean was different from 1.00); * *P* < 0.05 (Mean was different from 1.00); *** *P* < 0.001 (Mean was different from 1.00).

Our results indicate that in average, the EAA concentration across feeds decreased a 10 % (*P* < 0.05) after the pepsin-pancreatin incubation (Table 2), suggesting that EAA were more digestible in the small intestine than nonessential AA (NEAA). Other authors (Santos et al., 1984; Van Straalen et al., 1997) reported a preferential digestion of EAA in the small intestine. Among the individual EAA, Arg concentrations decreased significantly after pepsin-pancreatin incubation of rumen-preincubated feedstuffs (decreased in 10 of 11 rumen-preincubated feedstuffs, data not shown) with an average decrease of 39 % (Table 2). Proportions of Phe also tended to decrease (*P* = 0.10) as a result of pepsin-pancreatin incubation. These results suggest that Arg and Phe were among the most digestible EAA in most of the protein supplements tested. Similarly, Titgemeyer et al. (1989) and Erasmus et al. (1994) observed that Arg and Phe

appeared to be more absorbable or digestible than total RUP AA for most of the feedstuffs tested. Santos et al. (1984) and Erasmus et al. (1994) found the postruminal absorption of Met to be higher than other AA. However, the decrease in Met proportion found in our study was not significant. The high variation observed in Met values indicates, in agreement with results by Titgemeyer et al. (1989), that its intestinal digestion was feed-dependent. For the rest of EAA average changes were not significant, indicating that its profile did not change after pepsin-pancreatin incubation, or that its intestinal digestibility was feed-dependent. These differences in the intestinal disappearance of individual AA in RUP fraction among sources (Titgemeyer et al., 1989; Cros et al., 1992ab), would require the use of different digestibility coefficients for individual AA within each feedstuff.

5- Conclusions

The Daisy^{II} technique can be used to determine intestinal digestion of CP and AA. Compared with the original three-step procedure, the modifications introduced, i.e. incubating the samples in nylon bags and analyzing the residue for N and AA, or changing the type of pepsin, increase the number of samples that can be run at one time, result in a substantial reduction in cost and labor, and allow to detect differences between feedstuffs for individual AA digestibilities.

Results from the Daisy^{II} technique suggest that feedstuffs vary in the proportion of their AA that are digested in the small intestine. The use of the Daisy^{II} technique to obtain digestibility coefficients for individual AA would allow the selection of proteins with high digestibilities of those AA that are most likely to limit production.

CAPÍTULO 5

Discusión General

1. Introducción

Los experimentos 1 y 2 descritos en el presente trabajo forman parte del proyecto AGF97/0444 titulado “Desarrollo de un sistema de cultivo continuo de flujo doble para el estudio de la fermentación ruminal: Estudio de los factores que afectan al flujo de aminoácidos al intestino del rumiante”. Este proyecto se divide en dos grandes objetivos: 1) el estudio de los factores que afectan al aporte de aminoácidos de origen microbiano (Rodríguez, 2003) y 2) el estudio de los factores que afectan al aporte de aminoácidos de origen alimentario, objetivo en el que se basa la presente Tesis Doctoral. En concreto estos trabajos se centran en estudiar el efecto de la fermentación ruminal sobre el perfil de aminoácidos de la proteína procedente de cuatro suplementos proteicos (harina de soja tratada por calor, corn gluten meal, harina de sangre y harina de pescado).

El diseño de dichos experimentos (descritos en los capítulos 2 y 3, respectivamente) se basa en el uso de raciones que incluyan niveles crecientes de proteína no degradable en el rumen procedente de diferentes suplementos proteicos. Este diseño requiere que el resto de los nutrientes de las raciones se mantenga constante (carbohidratos no fibrosos, fibras, proteína bruta, cenizas) de manera que la única diferencia entre las distintas raciones venga dada por el nivel de proteína degradable. El incremento del aporte de proteína no degradable a nivel ruminal comporta una disminución en la concentración de N amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), ya que esta resulta de la degradación de la proteína de la dieta en el rumen. Teniendo en cuenta que en cada experimento se estudiaron 2 suplementos proteicos (2 de origen vegetal en el experimento 1: harina de soja tratada por calor y corn gluten meal; y 2 de origen animal en el experimento 2: harina de sangre y harina de pescado), que para cada suplemento se

diseñaron 4 raciones con distintos niveles de proteína no degradable (con el 0, 33, 66 o el 100% de la proteína suplementada procedente del suplemento proteico), y que los resultados obtenidos al administrar estas raciones a los fermentadores se obtuvieron por triplicado (cada experimento constaba de tres periodos experimentales), obtenemos un rango muy amplio de concentraciones de N amoniacal (de 2.53 a 55.19 mg/100ml). Estos márgenes tan amplios pueden ser una buena fuente de información para saber hasta qué punto puede afectar la concentración de N amoniacal a algunos de los principales parámetros de la fermentación ruminal.

Dado el amplio rango de datos disponible y la complejidad del diseño experimental se ha creído conveniente dividir esta discusión en dos grandes apartados. En el primer apartado se presentan varios gráficos que relacionan los resultados de algunos de los parámetros del metabolismo ruminal con la degradación de la proteína de la ración y con la concentración de N amoniacal. En el segundo apartado se realiza una justificación del diseño experimental utilizado, haciendo hincapié en el control de la fermentación ruminal y en el análisis de aminoácidos.

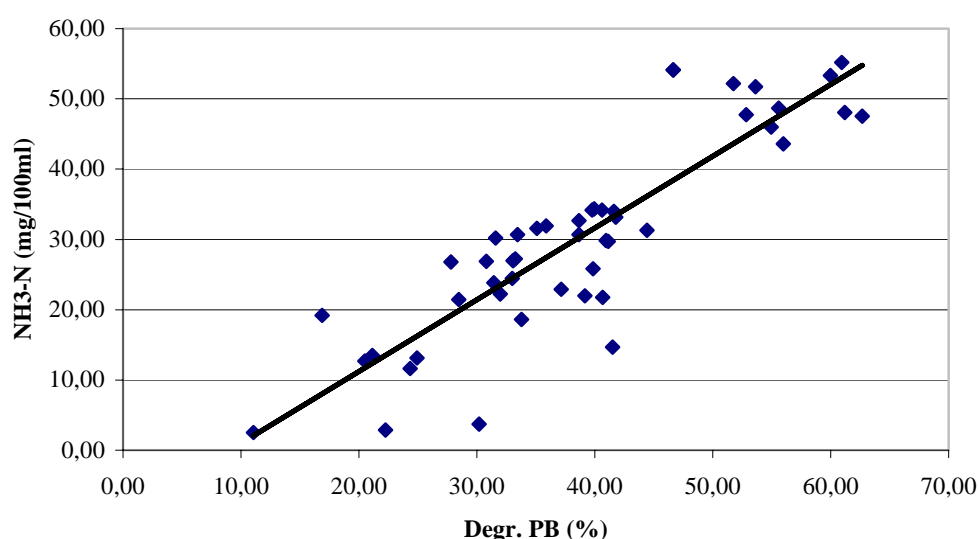
2- Fermentación ruminal

2.1- Efectos de la degradabilidad de la proteína sobre la fermentación ruminal

La Figura 1 muestra la evolución de la concentración de N amoniacal en función de la degradación de la proteína de la ración. Como ya se ha comentado, la concentración de N amoniacal es el producto final de la degradación proteica, por lo que cabe esperar que a mayores niveles de degradación de proteína se obtengan mayores

concentraciones de N amoniacal. Existen varios trabajos tanto *in vivo* (Windschitl and Stern, 1988; Coomer y col., 1993; Cunningham y col., 1994) como *in vitro* (Koeln and Paterson, 1986; Calsamiglia y col., 1995) que corroboran la reducción en la concentración de N amoniacal como consecuencia de administrar dietas ricas en proteínas protegidas en comparación con el uso de de proteínas degradables en el rumen.

Figura 1. Relación entre la degradación de la proteína de la ración (Degr. PB) y la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) ($y = 1,0212x - 9,2331$; $R^2 = 0,7626$).



El N no amoniacal comprende la suma del N bacteriano y el N alimentario no degradado. A diferencia de los estudios *in vivo*, los cultivos *in vitro* carecen de N endógeno, lo que facilita la elaboración y la precisión de los cálculos y predicciones. La suplementación con fuentes de proteína de baja degradabilidad ruminal resulta frecuentemente en una disminución en el flujo de nitrógeno bacteriano (Windschitl y

Stern, 1988; Waltz y Stern, 1989; Clark y col., 1992). Este efecto se ha atribuido a que las bacterias no disponen de suficiente N. Sin embargo, en el análisis de los datos de los experimentos 1 y 2 que se representan en la Figura 2, podemos observar cómo la correlación entre flujo de nitrógeno bacteriano y nivel de proteína degradable es prácticamente inexistente ($R^2 = 0,056$). De hecho, este es el efecto que se buscaba en el diseño experimental, y por ello al formular las raciones se aseguró que todas aportaran suficiente proteína degradable, péptidos y aminoácidos como para no limitar la síntesis de proteína bacteriana. El flujo de nitrógeno bacteriano sólo se vio afectado significativamente por la inclusión de niveles crecientes de harina de soja protegida, y en este caso el efecto observado fue el inverso, es decir con el nivel máximo de inclusión de proteína protegida (HSBM-100) se obtuvo un flujo de nitrógeno bacteriano superior al obtenido con niveles de inclusión inferiores (HSBM-33). En el resto de suplementos proteicos no se observaron diferencias significativas derivadas del aumento de proteína no degradable. En cuanto al flujo de nitrógeno dietario, como se puede observar en la Figura 2, aumenta de manera importante a medida que aumenta el aporte de proteína no degradable ($R^2 = 0,998$). Esta respuesta ya ha sido descrita en numerosas ocasiones (Santos y col., 1984; Windschitl y Stern, 1988; Clark y col., 1992; Calsamiglia y col., 1995) y es la consecuencia lógica de una menor degradación en el rumen de las proteínas protegidas aportadas por los suplementos proteicos.

Figura 2. Relación entre la degradación de la proteína de la ración (Degr. PB) y los flujos de nitrógeno bacteriano (N bact.) ($y = 0,0041x + 0,7969$; $R^2 = 0,056$) y nitrógeno dietario (N diet.) ($y = -0,0347x + 3,4266$; $R^2 = 0,9975$).

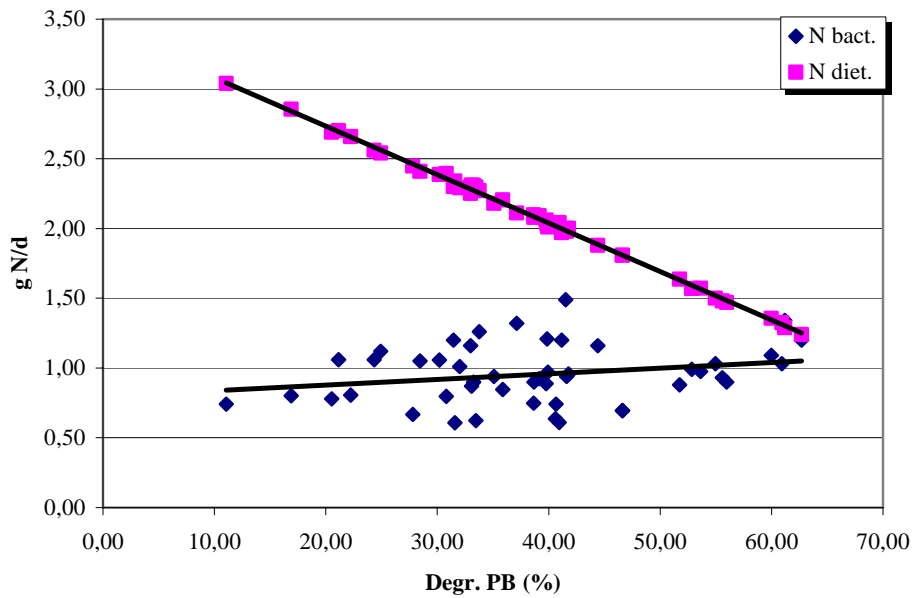


Figura 3. Relación entre la degradación de la proteína de la ración (Degr. PB) y el flujo de aminoácidos totales (AAT) ($y = -0,2832x + 28,924$; $R^2 = 0,5672$).

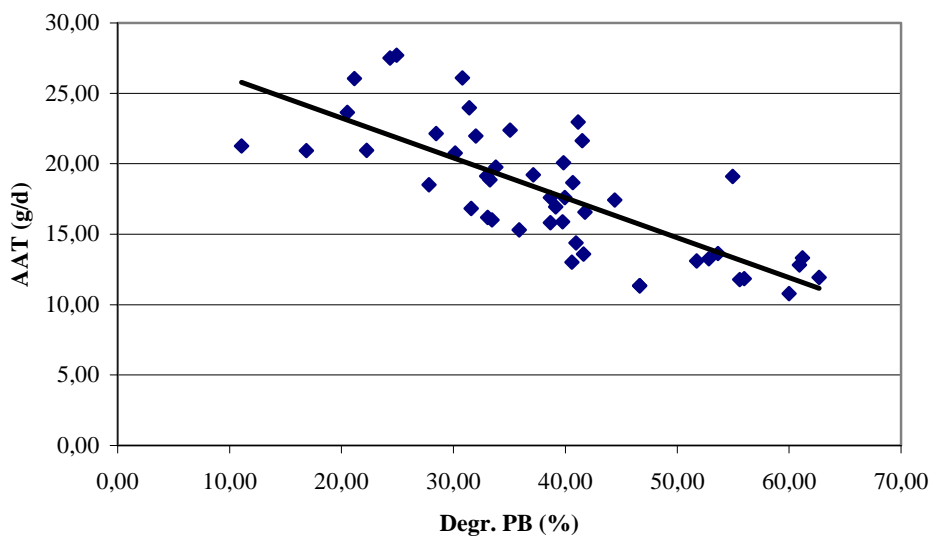


Figura 4. Relación entre la degradación de la proteína de la ración (Degr. PB) y el flujo de aminoácidos no esenciales (AAE) ($y = -0,1443x + 13,822$; $R^2 = 0,6782$).

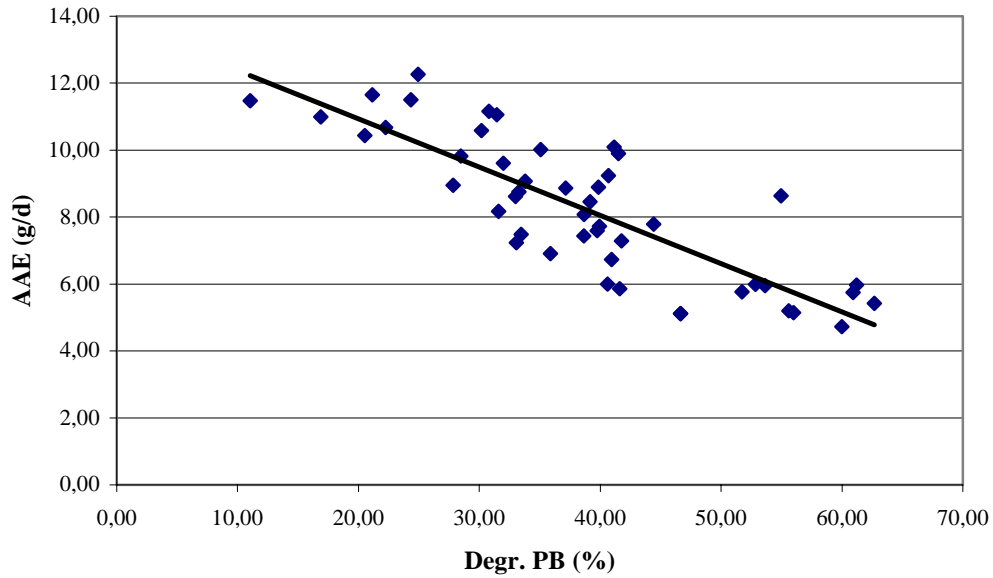
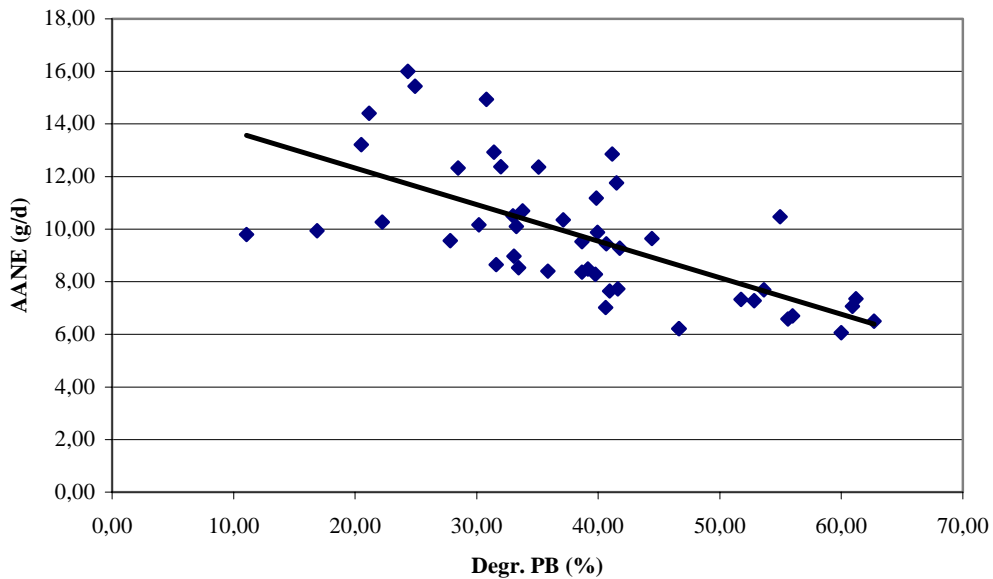


Figura 5. Relación entre la degradación de la proteína de la ración (Degr. PB) y el flujo de aminoácidos esenciales (AANE) ($y = -0,139x + 15,102$; $R^2 = 0,4356$).



Las Figuras 3 a 5 muestran los flujos de aminoácidos totales, esenciales y no esenciales en función de la degradabilidad de la proteína. En general el flujo de aminoácidos aumenta a medida que incorporamos proteínas protegidas a la ración, tal como era de esperar. Sin embargo, llama la atención que la degradación de la proteína de la ración se muestra más correlacionada con el flujo de aminoácidos esenciales (Figura 4; $R^2 = 0,678$) que con el flujo de aminoácidos no esenciales (Figura 5; $R^2 = 0,436$). Debemos tener en cuenta que cuando la proteína de la ración es muy degradable, el perfil de aminoácidos de la digesta que llega al duodeno será más parecido al perfil de la proteína microbiana. Sin embargo, a medida que aumenta la proporción de proteína no degradable de la ración, la composición en aminoácidos del contenido duodenal tiende a desviarse hacia el perfil marcado por la proteína de la ración, difiriendo del perfil de la proteína microbiana (Rulquin y Vérité, 1993). La Tabla 1 muestra las proporciones de aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales de los suplementos proteicos utilizados en los experimentos 1 y 2, y una media de la composición de las bacterias ruminales obtenida por Clark y col. (1992) a partir de 441 muestras bacterianas. En esta tabla podemos observar que las bacterias ruminales, de media, tienen una proporción de aminoácidos esenciales menor que la de los suplementos proteicos utilizados en nuestros trabajos, mientras que los suplementos utilizados (en especial la harina de sangre) son más pobres en aminoácidos no esenciales si los comparamos con las bacterias ruminales. De esta manera, es lógico que al aumentar el aporte de proteína no degradable obtengamos un mayor efecto sobre el flujo de aminoácidos esenciales que sobre el flujo de aminoácidos no esenciales.

Tabla 1. Proporción de aminoácidos esenciales (% AAE) y de aminoácidos no esenciales (% AANE) de las bacterias ruminales, de la harina de soja tratada por calor (HSBM), del corn gluten meal (CGM), de la harina de pescado (FM) y de la harina de sangre (BM).

Ingrediente	% AAE	% AANE
Bacterias ruminales¹	48.5	51.8
HSBM	55.6	44.4
CGM	60.5	39.5
FM	55.4	44.6
BM	73.2	26.8

¹Datos adaptados de Clark y col. (1992)

2.2- Efectos de la concentración de N amoniacal sobre la fermentación ruminal

En la Figura 6 se representa el efecto de la concentración de N amoniacal sobre la digestibilidad de la fibra neutro detergente. La fibra neutro detergente pertenece a los carbohidratos estructurales. Las bacterias celulolíticas son las encargadas de fermentar los carbohidratos estructurales y su principal fuente de N es el N amoniacal (Russell y col., 1992; Nolan, 1993). Esto puede hacer pensar que una disminución en la concentración de N amoniacal pueda afectar a la actividad fermentativa de estas bacterias. Sin embargo, como se observa en la Figura 6, las diferentes concentraciones de N amoniacal, en un rango entre 2.53 y 55.19 mg/100ml, no afectaron excesivamente a la digestión de la fibra neutro detergente y, de hecho, las diferencias observadas no resultaron significativas en ninguno de los dos experimentos. En un estudio similar realizado en cultivos continuos de flujo doble, Calsamiglia y col. (1995) tampoco

observaron diferencias significativas en la digestión ruminal de la fibra neutro detergente con unas concentraciones de N amoniacal que oscilaban entre 6.4 y 30.3 mg/100ml. En nuestro caso, las concentraciones de N amoniacal no estuvieron siempre por encima del mínimo de 5 mg/100ml propuesto por Satter y Slyter (1974), y sin embargo, como podemos observar, esto no implicó necesariamente la disminución de la degradación de la fibra. Es posible que las bacterias celulolíticas en estos casos utilizaran péptidos y aminoácidos en vez de N amoniacal, ya que las bajas concentraciones de N amoniacal correspondían en este caso al uso de raciones ricas en proteína verdadera. De hecho, Atasoglu y col. (2001) demostraron en cultivos puros de bacterias celulolíticas que la incorporación de N amoniacal a la célula bacteriana disminuía a medida que aumentaba la concentración de AA del medio, sugiriendo que las bacterias celulolíticas también podrían utilizar aminoácidos.

La disminución de la concentración de N amoniacal se mostró relacionada con un ligero descenso en la digestibilidad de la materia orgánica (Figura 7). Este descenso se podría atribuir a la resistencia de la proteína protegida de los suplementos a la degradación por parte de las bacterias ruminales, frente a la extensiva degradación de la urea y la triptona contenida en las dietas HSBM-0, CGM-0, FM-0 y BM-0. El aumento de la proporción de proteína protegida en el total de materia orgánica explicaría que por una parte la materia orgánica fuera menos digestible y, a la vez que la producción de N amoniacal fuera menor debido a esta menor degradación de la proteína. Sin embargo, estas diferencias sólo resultaron significativas en el caso de la suplementación de raciones con HSBM, donde la digestibilidad de la materia orgánica obtenida al administrar la ración HSBM-0 fue significativamente superior a la obtenida con HSBM-100.

Figura 6. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la digestibilidad de la fibra neutro detergente (DFND) ($y = 0,0295x + 19,766$; $R^2 = 0,0054$).

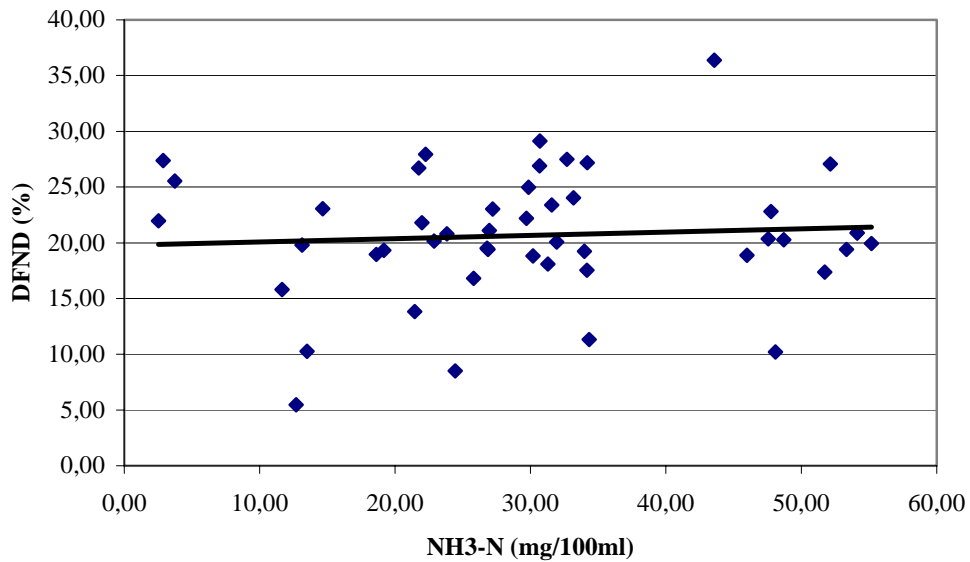
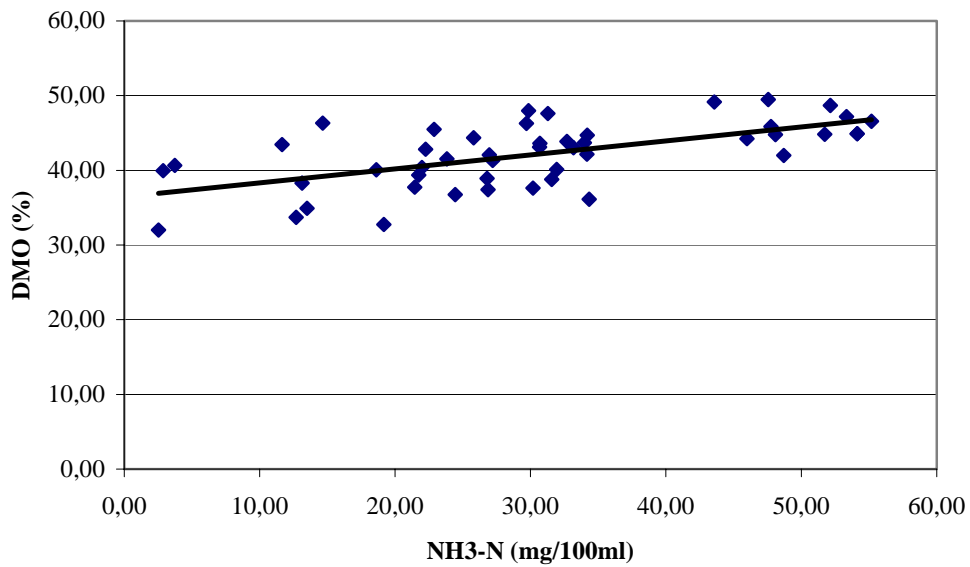
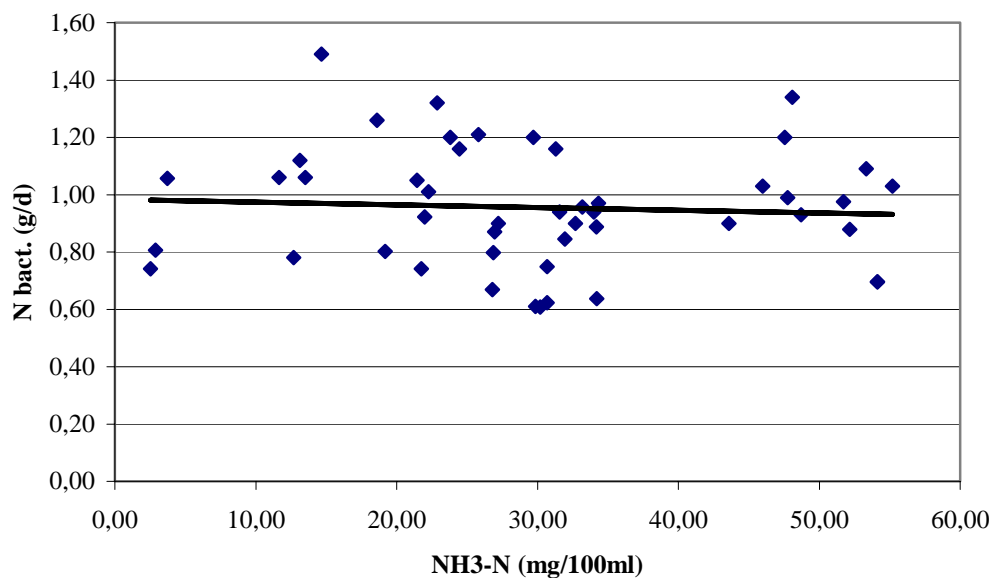


Figura 7. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) ($y = 0,1877x + 36,417$; $R^2 = 0,379$).



El N amoniacal se considera la principal fuente de N para la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hespell y Bryant, 1979; Wallace y Cotta, 1988; Mackie y White, 1990). El amoníaco puede ser utilizado por la mayoría de las especies bacterianas y, como ya se ha comentado, es muy importante para las celulolíticas (Nolan, 1993). Algunos autores han observado una disminución en el flujo de N bacteriano que pasa al intestino como consecuencia de la suplementación con fuentes de proteína de baja degradabilidad (Windschitl y Stern, 1988; Waltz y Stern, 1989; Hoover y Stokes, 1991; Clark y col., 1992). Otros, como Calsamiglia y col. (1995) no encontraron variaciones significativas en el flujo de N bacteriano al disminuir las concentraciones de N amoniacal en un rango entre 30.3 y 6.4 mg/100ml. En nuestro trabajo la síntesis de proteína microbiana se mantuvo en general bastante estable a pesar de las variaciones en la concentración de N amoniacal (Figura 8; $R^2 = 0,0041$), lo que indicaría que las bacterias no se vieron afectadas por los cambios en las concentraciones de N amoniacal. Tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 las diferencias en el flujo de N bacteriano debidas al tipo de suplemento proteico o al nivel de inclusión de éste no llegaron a ser significativas, y sólo en el experimento 1 se observó un mayor flujo de N bacteriano en el tratamiento HSBM-100 en comparación a un menor flujo en los tratamientos HSBM-33 y CGM-100. Sin embargo todas las raciones disponían de un nivel de proteína suficientemente elevado (22 %) como para incorporar cantidades importantes de proteína no degradable pero a la vez conseguir que todas las raciones, incluso las menos degradables, dispusieran de suficiente proteína degradable, péptidos y aminoácidos (mediante la incorporación de urea y triptona a las raciones) como para que la cantidad y forma de N en el rumen no limitara la síntesis bacteriana.

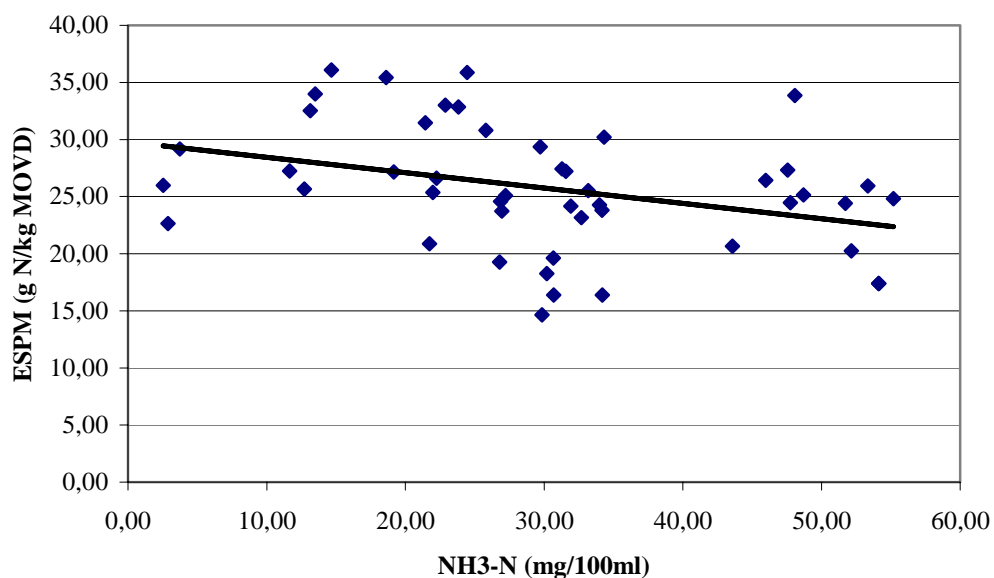
Figura 8. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y el flujo de N bacteriano (N_{bact.}) ($y = -0,0009x + 0,983$; $R^2 = 0,0041$).



En cuanto a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, contrariamente a lo que cabría esperar, en general desciende a medida que aumenta la concentración de N amoniacal. Aunque existe controversia sobre la concentración mínima de amoníaco para maximizar la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, el valor de 5 mg/100ml propuesto por Satter y Slyter (1974) suele ser utilizado como referencia. Sin embargo, en la literatura se encuentra un rango muy variable de valores óptimos que oscilan entre 1.7 mg/100ml (Shaefen y col., 1980) y más de 23.5 mg/100 ml (Mehrez y col., 1977). En nuestro trabajo, la concentración mínima de N amoniacal obtenida fue de 2.53 mg/100 ml, por tanto inferior al valor propuesto por Satter y Slyter (1974), y aun así la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana fue superior a la obtenida con algunas concentraciones superiores de N amoniacal (Figura 9). En el caso de las dietas suplementadas con

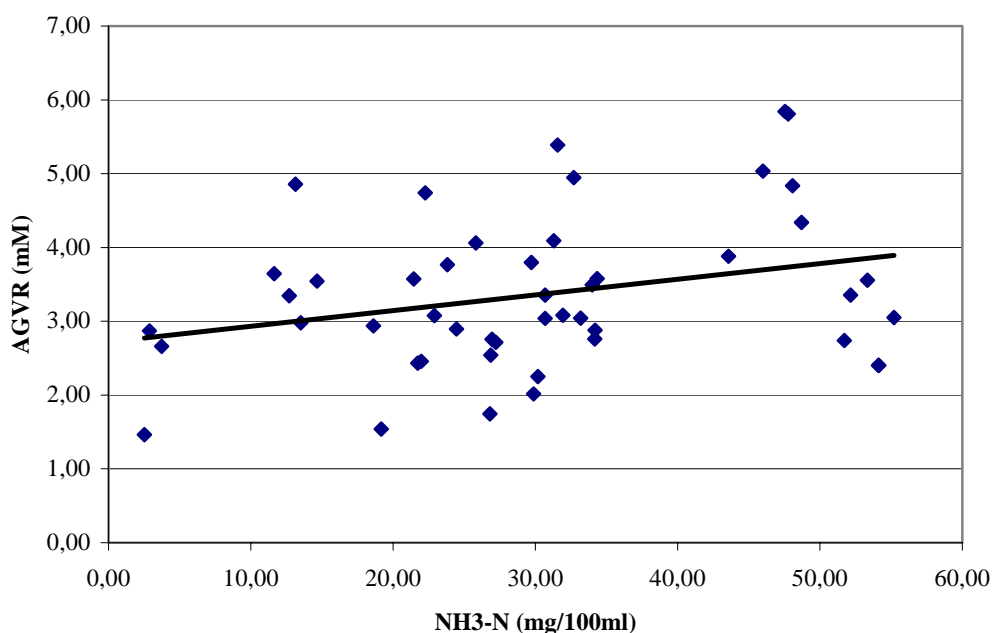
HSBM, la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana obtenida con HSBM-100 y HSBM-66 fue significativamente superior a la obtenida con HSBM-33 y HSBM-0. Sin embargo, considerando que la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana se refiere a los gramos de N bacteriano sintetizados por kilogramo de materia orgánica verdaderamente digerida en el rumen (MOVD) es lógico que la eficiencia aumente con la dieta HSBM-100, ya que como se ha comentado en los puntos anteriores, en este caso coincide el mayor flujo de N bacteriano con la menor digestibilidad de la materia orgánica. Esto podría ser debido a que las bacterias utilizaran péptidos y aminoácidos en lugar de N amoniacal para la síntesis de sus proteínas mejorando así su eficiencia. Hay que destacar que las mayores concentraciones de amoníaco provienen del uso de dietas ricas en nitrógeno no proteico, por lo que una sustitución de este por la proteína verdadera aportada por la inclusión de suplementos proteicos aumentaría la disponibilidad de péptidos y aminoácidos frente a una menor disponibilidad de amoníaco. Varios investigadores han observado mejoras en el crecimiento o en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana al suplementar N mediante péptidos y aminoácidos (Russell y Sniffen, 1984; Argyle y Baldwin, 1989). La mejoría en la eficiencia de síntesis con aminoácidos y péptidos preformados puede ser debida al ahorro energético en los procesos de síntesis, por una incorporación directa a la proteína microbiana (Bryant, 1973; Demeyer y Van Nevel, 1986).

Figura 9. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM) ($y = -0,1344x + 29,779$; $R^2 = 0,1225$).



Los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGVR) isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato, resultan de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina, respectivamente, por lo que se suele asociar una mayor concentración de N amoniacal (resultado de la degradación de proteínas y aminoácidos) a una mayor concentración de AGVR. La Figura 10 muestra que aunque la cantidad de AGVR aumentó a medida que aumentaba la concentración de N amoniacal, la correlación observada entre ambos parámetros fue baja ($R^2 = 0.08$).

Figura 10. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR) ($y = 0,0213x + 2,722$; $R^2 = 0,0836$).



En este caso hay que tener en cuenta que no todo el N amoniacal puede ser atribuido a la degradación de aminoácidos de cadena ramificada sino que corresponde a la degradación de la proteína total y del N no proteico de la ración. Si sólo consideráramos el N amoniacal procedente de estos aminoácidos, probablemente el resultado sería diferente. Cada suplemento proteico contiene unas proporciones determinadas de cada uno de estos aminoácidos (Tabla 2), y es posible que a la vez la degradabilidad de estos aminoácidos concretos varíe de un suplemento a otro y sea diferente a la degradabilidad de la proteína total (Tabla 3).

Tabla 2. Contenido en aminoácidos de cadena ramificada (g/100g de AA totales analizados) de la harina de soja tratada por calor (HSBM), del corn gluten meal (CGM), de la harina de pescado (FM) y de la harina de sangre (BM). (Datos obtenidos de los experimentos 1 y 2).

Aminoácido (g)	HSBM	CGM	FM	BM
Valina	6.85	7.11	6.66	11.34
Isoleucina	7.11	7.31	5.83	0.94
Leucina	10.27	22.88	8.02	14.36
Totales	100	100	100	100

Tabla 3. Escape ruminal relativo de los aminoácidos de cadena ramificada de la harina de soja tratada por calor (HSBM), del corn gluten meal (CGM), de la harina de pescado (FM) y de la harina de sangre (BM). (Datos obtenidos de los experimentos 1 y 2).

Aminoácido	HSBM	CGM	FM	BM
Valina	0.89	0.65	0.95	0.99
Isoleucina	0.90	0.63	0.82	-0.76
Leucina	0.86	0.79	1.14	1.22
Totales	1.00	1.00	1.00	1.00

Por este motivo, los gráficos que muestran la relación entre N amoniacal y producción de ácidos grasos volátiles ramificados se presentarán por separado para cada suplemento proteico (Figuras 11 a 22), aunque no se disponen datos de la producción de 2-metilbutirato.

Figura 11. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR) en la harina de soja tratada por calor ($y = 0,0713x + 1,8301$; $R^2 = 0,6564$).

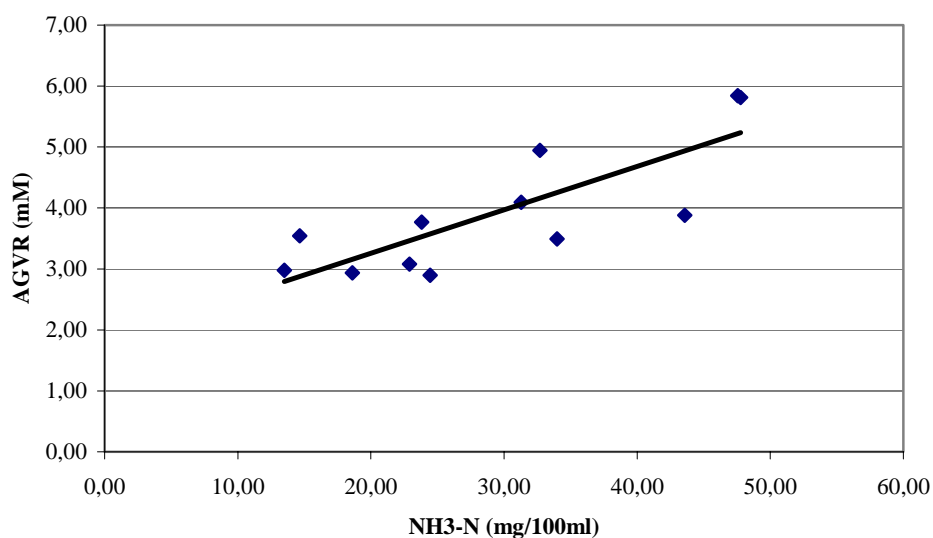


Figura 12. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isobutirato en la harina de soja tratada por calor ($y = 0,0252x + 0,4504$; $R^2 = 0,6575$).

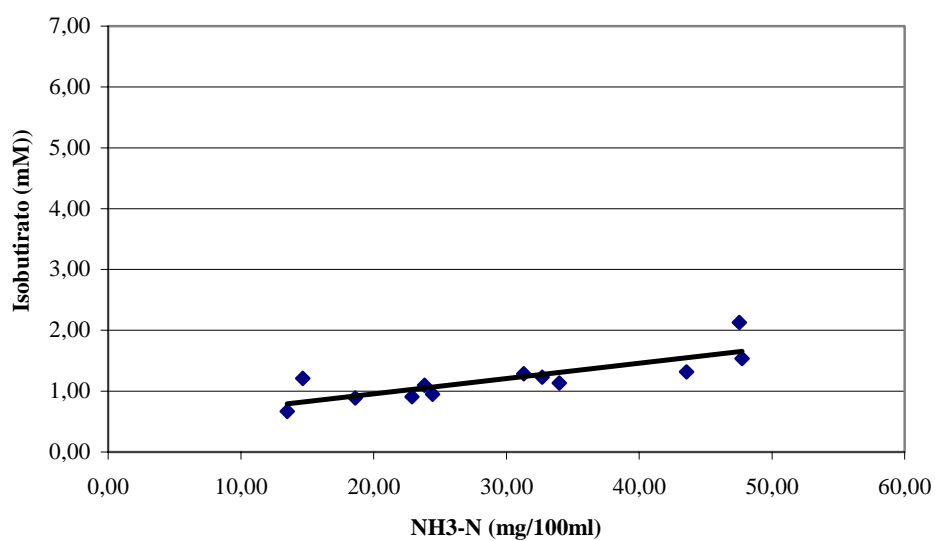


Figura 13. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isovalerato en la harina de soja tratada por calor ($y = 0,0461x + 1,3797$; $R^2 = 0,543$).

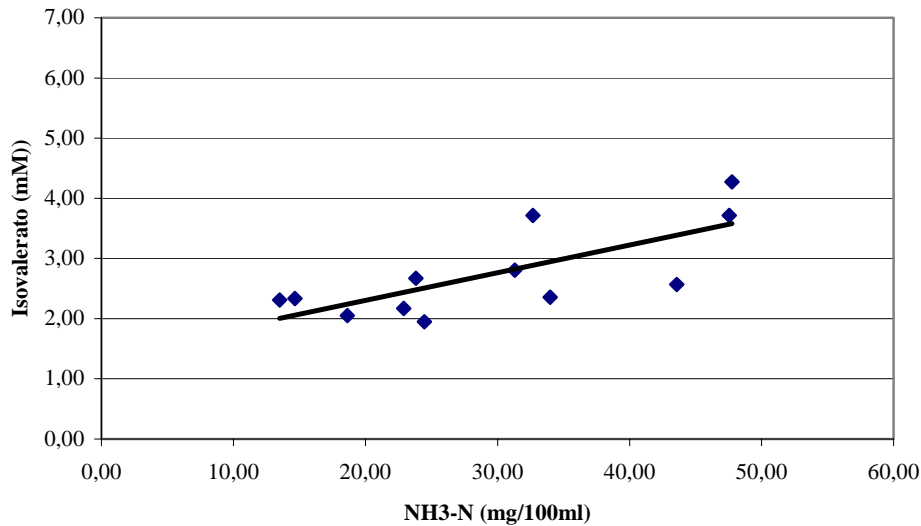


Figura 14. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR) en el corn gluten meal ($y = 0,0216x + 3,6449$; $R^2 = 0,1799$).

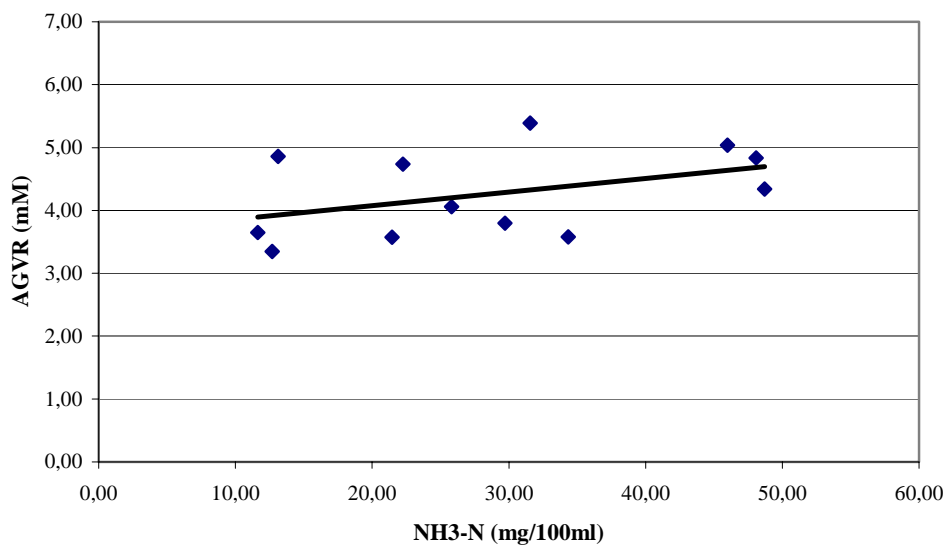


Figura 15. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isobutirato en el corn gluten meal ($y = 0,0149x + 0,7919$; $R^2 = 0,8676$).

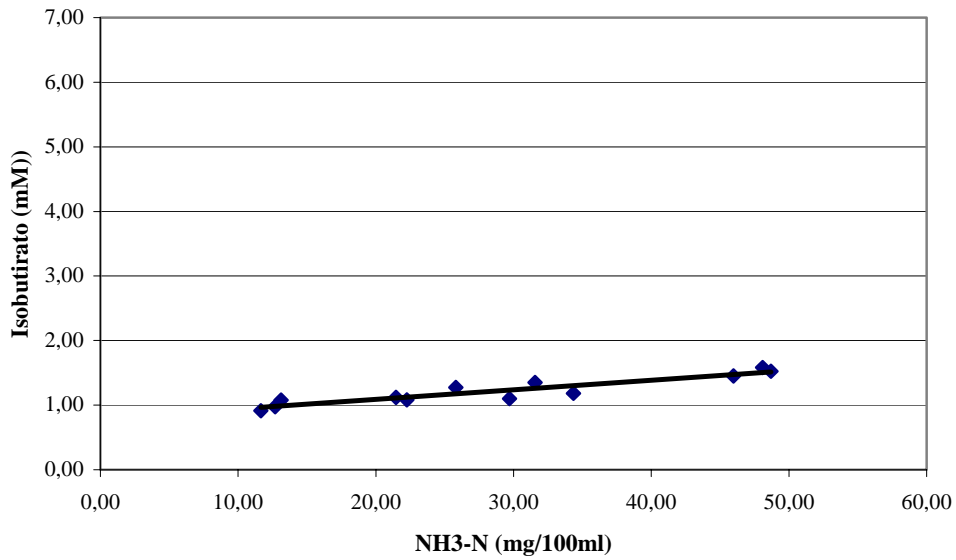


Figura 16. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isovalerato en el corn gluten meal ($y = 0,0067x + 2,8529$; $R^2 = 0,0236$).

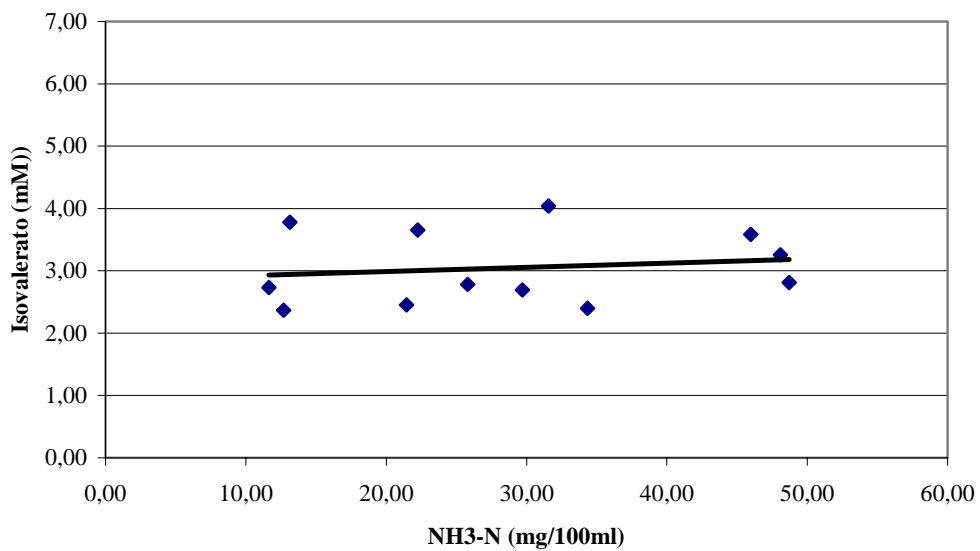


Figura 17. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR) en la harina de pescado ($y = 0,0136x + 2,2511$; $R^2 = 0,0822$).

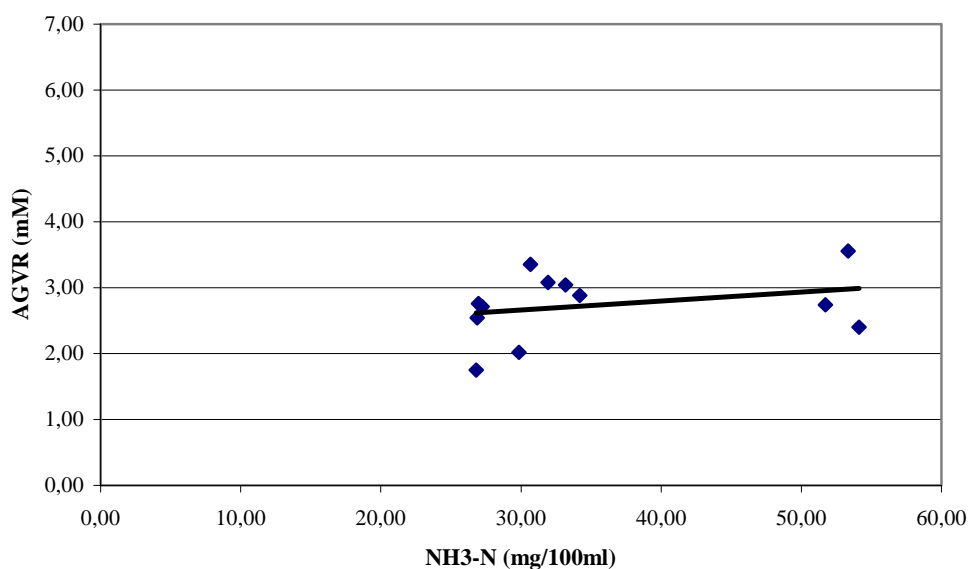


Figura 18. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isobutirato en la harina de pescado ($y = 0,0071x + 0,6421$; $R^2 = 0,1553$).

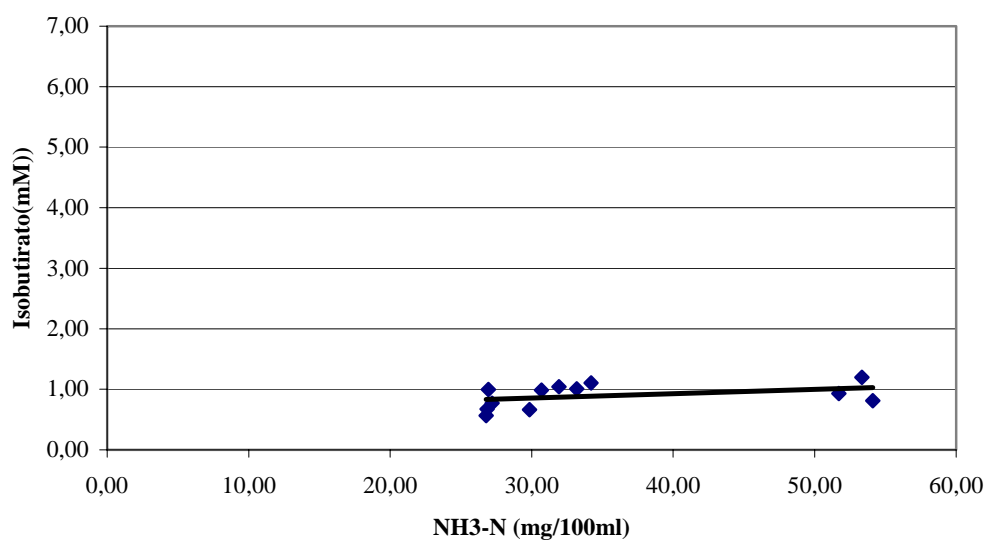


Figura 19. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isovalerato en la harina de pescado ($y = 0,0065x + 1,608$; $R^2 = 0,0401$).

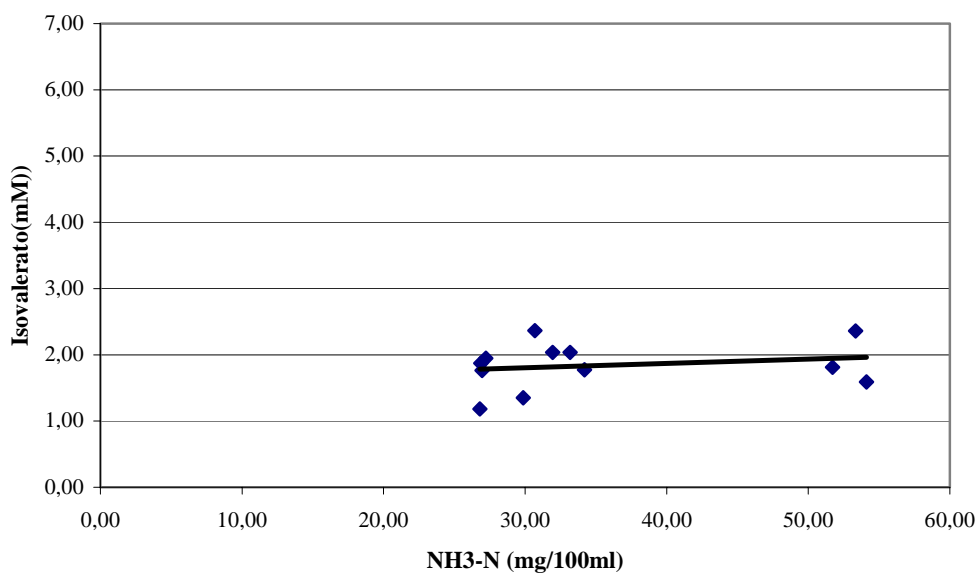


Figura 20. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGVR) en la harina de sangre ($y = 0,0143x + 2,1343$; $R^2 = 0,2287$).

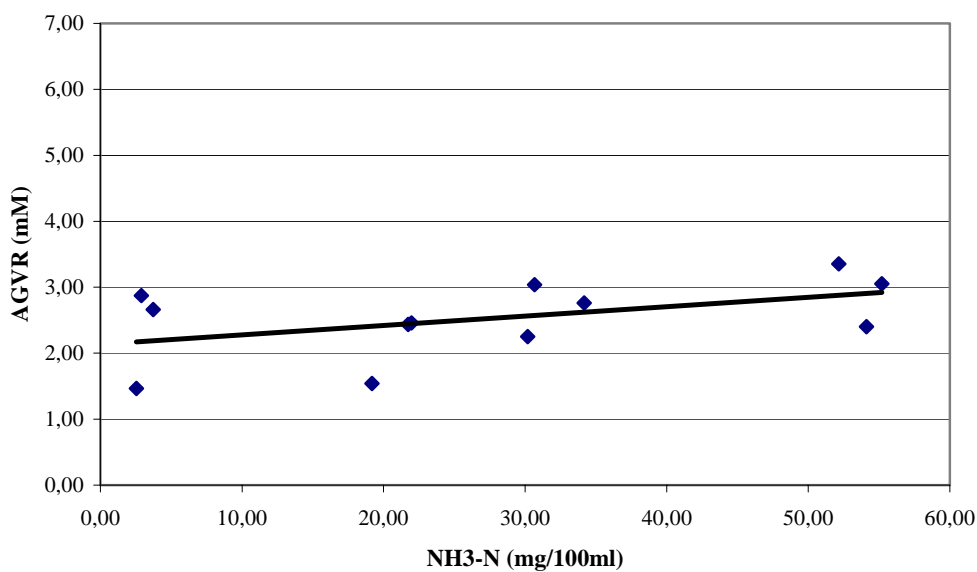


Figura 21. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isobutirato en la harina de sangre ($y = 0,0062x + 0,627$; $R^2 = 0,3364$).

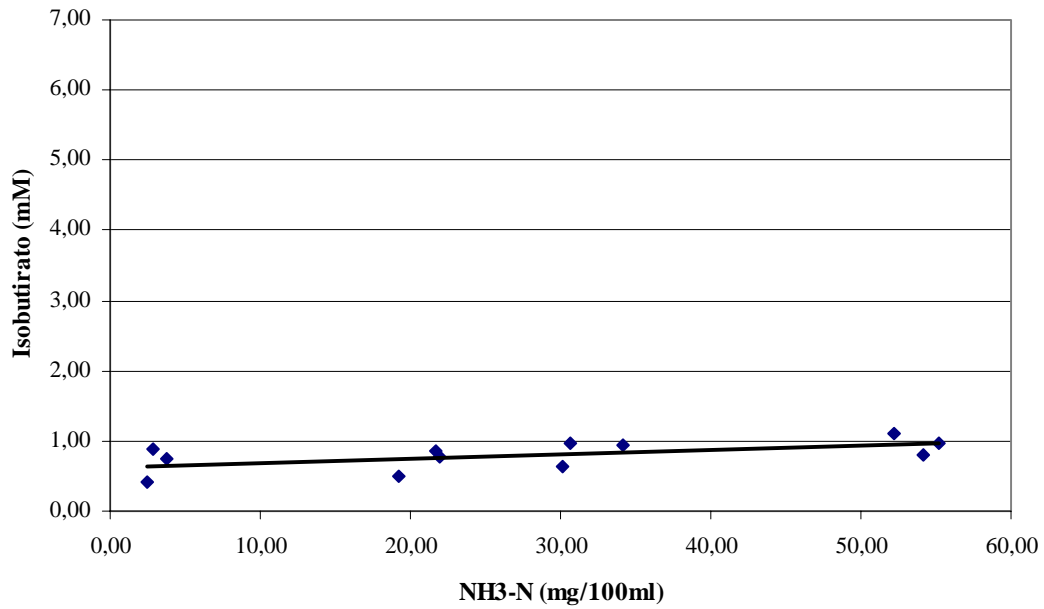
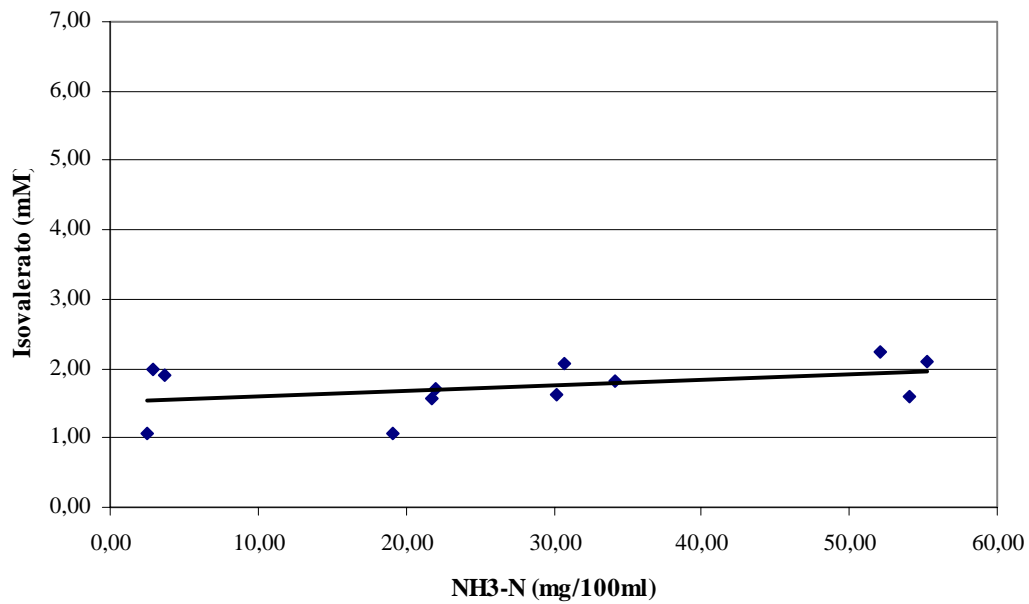


Figura 22. Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal (NH₃-N) y la producción de isovalerato en la harina de sangre ($y = 0,008x + 1,5069$; $R^2 = 0,1674$).



La Figura 11 muestra la relación entre la concentración de N amoniacal y la producción de AGVR en las raciones suplementadas con harina de soja tratada por calor (HSBM). En este caso, y coincidiendo con otros autores (Blake y Stern, 1988; Waltz y Stern, 1989) la reducción de la degradación de la proteína en el rumen y por tanto la disminución de la concentración de N amoniacal, se asocia con un descenso en la producción de AGVR ($R^2 = 0.66$). Esta relación también se observa si se presentan los AGVR por separado, aunque es más marcada en el caso del isobutirato ($R^2 = 0.66$) que en el isovalerato ($R^2 = 0.54$) (Figuras 12 y 13). Como ya se ha comentado, la producción de isobutirato resulta de la degradación en el rumen del aminoácido valina, mientras que el isovalerato se obtiene a partir de la degradación de la leucina, por lo que si disminuye la cantidad de valina o de leucina degradable también lo hará la producción de sus correspondientes AGVR. Tal como muestra la Tabla 2, la HSBM tiene un contenido moderado en estos dos aminoácidos si la comparamos con los otros suplementos estudiados. A la vez, la degradabilidad de estos dos aminoácidos en la HSBM no se caracteriza por ser excesivamente alta ni excesivamente baja si la comparamos con la degradabilidad de sus aminoácidos totales (Tabla 3), por lo que nos encontramos ante un suplemento proteico bastante equilibrado en cuanto a estos aminoácidos. En el caso del corn gluten meal (CGM), si bien las expectativas se cumplen en el caso del isobutirato (Figura 15; $R^2 = 0.87$), la correlación entre concentración de N amoniacal y producción de isovalerato es prácticamente inexistente (Figura 16; $R^2 = 0.02$). El CGM es un suplemento proteico muy rico en leucina (Tabla 2). Sin embargo, su leucina es muy degradable en el rumen en comparación al total de aminoácidos aportados por este suplemento (Tabla 3), lo que explica que la inclusión de CGM a las raciones, a pesar de ser una fuente de proteína protegida, mantenga unos aportes elevados de leucina

degradable en el rumen, y por lo tanto hace que la producción de isovalerato se mantenga elevada. Así, el CGM es un buen ejemplo de que el aumento de proteína no degradable y por lo tanto la disminución en la concentración de N amoniacal, no tiene que ir acompañada necesariamente de una disminución en la concentración de AGVR. Como se puede observar en las Figuras 17 a 22 la producción general de AGVR en los casos en los que se suplementaron las raciones con harina de pescado (FM) o con harina de sangre (BM) fue baja, siendo especialmente baja la producción de isovalerato. Esto puede ser debido a que son fuentes de proteína de muy baja degradabilidad ruminal en general, y en particular cabe destacar la baja degradabilidad de la leucina entre los aminoácidos de cadena ramificada (Tabla 3), lo que explicaría la menor formación de isovalerato. Sin embargo, a diferencia de lo que cabría esperar, la producción de AGVR en las dietas FM-0 y BM-0 también resultó muy baja a diferencia de la observada para las dietas HSBM-0 y CGM-0, probablemente debido a algún efecto del período experimental.

En resumen, las Figuras 11-22 reflejan en general una mayor relación entre cantidad de N amoniacal e isobutirato que entre cantidad de N amoniacal e isovalerato. Esto se podría explicar por las diferencias en la cantidad y en la degradabilidad de los aminoácidos valina y leucina. Si las cantidades de N amoniacal procedentes de la degradación de valina son diferentes de las concentraciones de N amoniacal derivadas de la degradación de leucina, resulta lógico que las correlaciones cambien si para ambos casos estamos utilizando el mismo rango de concentración de N amoniacal (que nuestro caso corresponde a la degradación de la proteína total). A estas diferencias hay que añadirle además las diferencias en el contenido y en la degradación de cada uno de estos aminoácidos entre suplementos (Tablas 1 y 2), y ello nos explicaría que las correlaciones

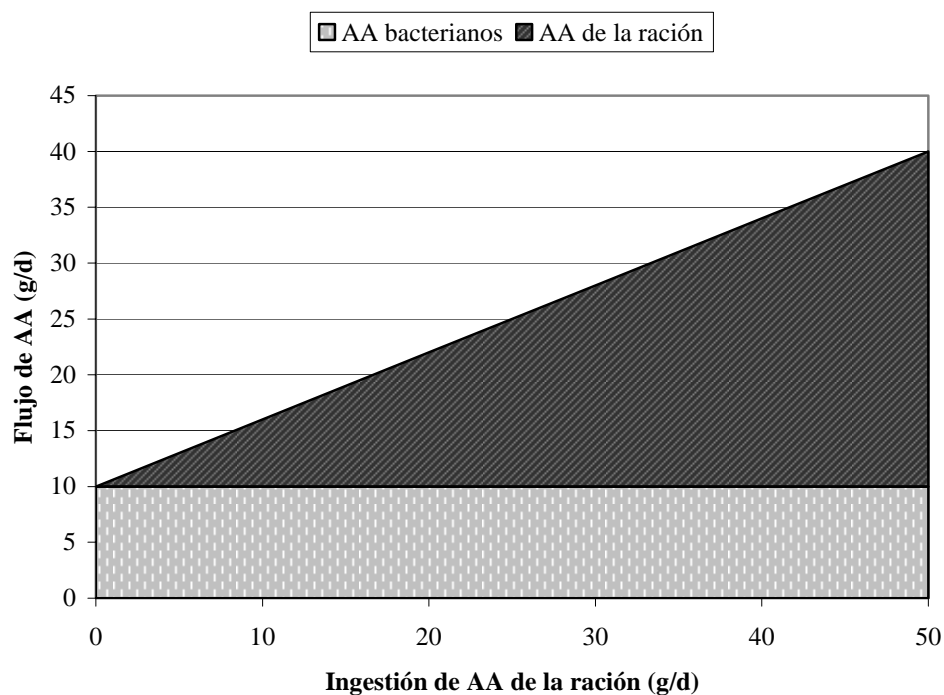
obtenidas en las Figuras 11-22 sean tan distintas. Estos datos serían indicativos de una degradación diferencial entre los distintos aminoácidos ramificados y de las diferencias en la degradación de un mismo aminoácido entre suplementos proteicos diferentes.

3- Diseño experimental

La mayoría de los trabajos que encontramos en la bibliografía (Crooker y col., 1986, 1987; Susmel y col., 1989; Erasmus y col., 1994; Maiga y col., 1996; O'Mara y col., 1997; González y col., 2001) utilizan la técnica de incubación de bolsas de nylon *in situ* para determinar la degradabilidad de los aminoácidos en el rumen. Sin embargo, como ya se ha comentado, el hecho de realizar incubaciones puntuales sin considerar los ritmos de paso o la contaminación bacteriana de los residuos son algunos factores que pueden alterar los resultados. Por otro lado, los estudios de los cambios producidos por la fermentación ruminal en el perfil de aminoácidos de suplementos proteicos *in vivo* son muy escasos (Stern y col., 1983; Titgemeyer y col., 1989) debido a su dificultad, ya que existen varios parámetros difíciles de controlar (pH ruminal, ingestión de alimentos, ritmos de paso, etc.) que pueden afectar al aporte de aminoácidos al intestino delgado y confundir los resultados. El diseño de los experimentos 1 y 2 se basa en la técnica de las pendientes utilizada anteriormente por Stern y col. (1983) y por Titgemeyer y col. (1989). Esta técnica consiste en formular para cada suplemento proteico diversas raciones con niveles crecientes de proteína no degradable en el rumen aportada por este suplemento. El análisis de los datos requiere asumir una serie de premisas: 1) El aporte de proteína y aminoácidos procedente de la ración base debe ser constante, por lo que las raciones deben estar formuladas para garantizar una fermentación homogénea entre

todos los tratamientos; y 2) las raciones deben estar formuladas de manera que todas ellas garanticen una síntesis de proteína bacteriana similar, ya que este método asume que la contribución de la proteína microbiana a la digesta duodenal es la misma para todas las dietas. Si se consigue que el aporte de aminoácidos procedentes de la ración base y de origen bacteriano no varíe entre los diferentes niveles de suplementación de proteína no degradable, todos los cambios observados en el flujo duodenal de proteína y aminoácidos pueden ser atribuidos exclusivamente al aporte de aminoácidos no degradados en el rumen procedentes del suplemento proteico en estudio. De esta manera, si se hace una regresión entre la ingestión de aminoácidos (X) y el flujo duodenal de aminoácidos (Y) tal como muestra la Figura 23, los cambios en el flujo de aminoácidos son debidos únicamente al suplemento proteico y, por consiguiente, la pendiente es representativa de los aminoácidos aportados por el suplemento proteico que no han sido degradados en el rumen. A partir de este principio, consiste en realizar una regresión para cada uno de los aminoácidos de cada suplemento proteico y comparar las pendientes obtenidas para ver si dentro de un mismo suplemento proteico todos los aminoácidos se degradan por igual o por el contrario, algunos aminoácidos son más degradables en el rumen que otros. Esta técnica también permite observar posibles diferencias en la degradación de un mismo aminoácido entre suplementos proteicos diferentes.

Figura 23. Representación del principio de la técnica de las pendientes.



3.1- Control de la fermentación ruminal

Tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 se observaron diferencias importantes entre los aminoácidos individuales en cuanto a la capacidad de escapar de la degradación ruminal. Sin embargo, la gran variabilidad obtenida en los resultados hizo que en la mayoría de ocasiones no fuera posible declarar estas diferencias como significativas. Esta falta de capacidad de identificar problemas podría atribuirse a variación asociada a la fermentación. Para aplicar con éxito esta técnica es necesario mantener controlados múltiples factores (pH ruminal, tasa de dilución de sólidos y líquidos, composición de la ración, ingestión...) que pueden afectar tanto al flujo de aminoácidos de origen bacteriano como al flujo de aminoácidos de origen alimentario.

El sistema de cultivo continuo de flujo doble, donde los factores que afectan a la síntesis de proteína microbiana se pueden controlar cuidadosamente, constituye un modelo ideal para mejorar la precisión y evitar la incertidumbre asociada a la variabilidad animal de los estudios de pendientes realizados *in vivo*. El planteamiento experimental de la tesis (experimentos 1 y 2) es sólido y se basa en que:

a) En el sistema de cultivo continuo de flujo doble utilizado en los experimentos 1 y 2, se controla el pH, la temperatura, el volumen de fermentación, el suministro de alimento y los ritmos de paso de las fracciones sólida y líquida.

b) Las raciones se diseñaron para garantizar una fermentación homogénea y un flujo de aminoácidos de origen bacteriano similar entre tratamientos.

Los resultados discutidos en el apartado anterior (figuras 1 a 22) así como en los capítulos 2 y 3, demuestran que los parámetros básicos de la fermentación (como digestión de la fibra, producción de ácidos grasos volátiles totales y relación acetato:propionato) y los flujos de N bacteriano se mantuvieron prácticamente constantes entre tratamientos. En consecuencia, las raciones diseñadas alcanzaron los objetivos planteados. Con ello, parece justificado calcular el escape ruminal relativo de los aminoácidos individuales dentro de cada suplemento proteico mediante la técnica descrita.

3.2- Análisis de aminoácidos

En cuanto a errores de análisis como causa de la variabilidad de resultados, las determinaciones de los perfiles de aminoácidos de los suplementos proteicos y de las

muestras de efluentes se llevaron a cabo mediante una técnica en la que se utilizaron patrones de referencia para detectar y corregir los posibles errores. Para establecer los factores de corrección en cada tanda de hidrólisis se incluyeron dos muestras de lisozima (con un perfil de aminoácidos conocido) como muestra patrón, y a la vez a cada una de las muestras a analizar se le añadieron 10µl de norleucina 20mM como estándar interno. La estabilidad de los residuos de metionina de las muestras durante la hidrólisis se consiguió añadiendo mercaptoetanol como agente reductor. Finalmente, para establecer los controles correspondientes a la derivatización y análisis de las muestras mediante HPLC (de acuerdo al procedimiento establecido por Vendrell y Avilés, 1986) se sometieron a este proceso, además de las muestras de lisozima, unas muestras estándar de aminoácidos (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) como estándares de calibración. Con ello se trató de controlar todo el proceso de preparación de muestras y análisis de aminoácidos y corregir los posibles errores y desviaciones.

Los experimentos 1 y 2 demuestran que, a pesar de las medidas de control establecidas tanto a nivel de fermentación ruminal como a nivel de análisis de aminoácidos, la obtención de resultados más precisos que nos permitan establecer valores concretos de degradación ruminal para cada aminoácido parece ser un objetivo difícil de alcanzar.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales en las cuales se realizó la presente Tesis Doctoral, podemos concluir:

1. La incorporación de niveles crecientes de proteína no degradable en el rumen procedente de suplementos proteicos no afectó de manera importante a la digestión de la fibra, a la concentración de ácidos grasos volátiles totales, ni a las proporciones molares de acetato, propionato y butirato, sugiriendo que la fermentación se mantuvo constante.
2. Los flujos de N dietario y de aminoácidos aumentaron a medida que se incrementó el aporte de suplementos de proteína no degradable a las raciones.
3. Los flujos de N bacteriano y la eficiencia de síntesis de proteína bacteriana en general se mantuvieron constantes a pesar del incremento del nivel de proteína no degradable de las raciones. Sólo en el caso de la inclusión de niveles elevados de harina de soja tratada por calor se observó un ligero aumento en el flujo y en la eficiencia de síntesis de N bacteriano respecto al observado con niveles de suplementación menores.
4. La resistencia a la degradación por parte de las bacterias ruminales difirió entre aminoácidos de un mismo suplemento proteico. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad y a pesar del control de los posibles factores de variación, en muchos casos estas diferencias no llegaron a ser significativas.
5. Excepto para el aspártico, el glutámico y la tirosina que en todos los casos fueron menos degradables que los aminoácidos totales, para el resto de aminoácidos no

se puede establecer un comportamiento general, ya que las modificaciones en el perfil de aminoácidos producidas por la fermentación ruminal variaron dependiendo del suplemento proteico. Esto sugiere que no sólo existen diferencias en la degradabilidad de los aminoácidos dentro de un mismo suplemento sino que también existen diferencias entre suplementos proteicos.

6. La técnica Daisy^{II} permite la obtención de valores de digestión intestinal tanto de proteínas como de aminoácidos individuales de una forma rápida, sencilla y económica.
7. En general la concentración media de aminoácidos esenciales disminuyó significativamente tras la digestión intestinal en el Daisy^{II} indicando una mayor digestibilidad intestinal de los aminoácidos esenciales frente a los no esenciales. En concreto, la arginina y en menor proporción la fenilalanina resultaron los más digestibles.
8. Los resultados obtenidos mediante la técnica Daisy^{II} sugieren que la proporción de cada aminoácido que se digiere a nivel intestinal varía en función del suplemento proteico.

CAPÍTULO 7

Referencias Bibliográficas

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Argyle, J. L., and R. L. Baldwin. 1989. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. *J. Dairy Sci.* 72:2017-2027.
- Ashes, J. R., J. L. Mangan, and G. S. Sidhu. 1984. Nutritional availability of amino acids from protein cross-linked to protect against degradation in the rumen. *Br. J. Nutr.* 52:239-47.
- Atasoglu, C., C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2001. Incorporation of [^{15}N] ammonia by cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* sy3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2819-2822.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88:E9-E21.
- Balcells, J., J. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Blake, W. L., and M. D. Stern. 1988. Influence of protein source on amino acid profile of effluent flowing from continuous culture of ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 66:2284-2298.
- Brandt, M., K. Rohr, and P. Lezien. 1980. Bestimmung des endogenen Protein-N in Duodenalchymus von Milchkhen mit Hilfe von ^{15}N . *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 44:26.

- Brock, F. M., C. W. Forsberg, and J. G. Buchanan-Smith. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:561-569.
- Broderick, G. A. 1986. Relative value of solvent and expeller soybeanmeal for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:2948-2958.
- Broderick, G. A., and N. R. Merchen. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75:2618-2632.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. R. Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. Pages 541-592 in *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima, eds. Academic press., Orlando, Fl. USA.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32:1809-1813.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, and C. Kamel. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88:2508-2516.
- Calsamiglia, S., and M. D. Stern. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:1459-1465.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and B. A. Crooker. 1992. Effects of diets formulated to contain different amounts of rumen non-degradable protein on microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39:239-252.

- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion in vitro. *J. Anim. Sci.* 73:1819-1827.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74:1375-1381.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2000. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 83(Suppl. 1):265.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2002. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 85(Suppl. 1):182.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230-3236.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. L. Berger, and G. C. Fahey, Jr. 1990. Intestinal Supply of amino acids in sheep fed alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw-based diets supplemented with soybean meal or combinations of corn gluten meal and blood meal. *J. Anim. Sci.* 68:467-477.
- Chalupa, W. 1976. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *J. Anim. Sci.* 43:828-834.
- Chalupa, W. 1984. Discussion of protein symposium: Protein nutrition of the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67:1134-1143.
- Chalupa, W., and C. J. Sniffen. 1996. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle-today and tomorrow. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58:65-75.

- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Chen, G. C., and J. B. Russell. 1991. Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation and deamination by mixed ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 69:2196-2203.
- Clark, J. H., M. R. Murphy, and B. A. Crooker. 1987. Supplying the protein needs of dairy cattle from by-product feeds. *J. Dairy Sci.* 70:1092-1109.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304-2323.
- Cleale, R. M., T. J. Klopfenstein, R. A. Britton, L. D. Satterlee, and S. R. Lowry. 1987a. Induced nonenzymatic browning of soybean meal. I. Effects of factors controlling nonenzymatic browning on in vitro ammonia release. *J. Anim. Sci.* 65:1312-1318.
- Cleale, R. M., R. A. Britton, T. J. Klopfenstein, M. L. Bauer, D. L. Harmon, and L. D. Satterlee. 1987b. Induced nonenzymatic browning of soybean meal. II. Ruminal escape and net portal absorption of soybean protein treated with xylose. *J. Anim. Sci.* 65:1319-1326.
- Cleale, R. M., T. J. Klopfenstein, R. A. Britton, L. D. Satterlee, and S. R. Lowry. 1987c. Induced nonenzymatic browning of soybean meal. III. Digestibility and efficiency of protein utilization by ruminants of soybean meal treated with xylose or glucose. *J. Anim. Sci.* 65:1327-1335.

- Colucci, P. E., G. K. Macleod, W. L. Grovum, I. McMillan, and D. J. Barney. 1990. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J. Dairy Sci.* 73:2143-2156.
- Coomer, J. C., H. E. Amos, M. A. Froetschel, K. K. Ragland, and C. C. Williams. 1993. Effects of supplemental protein source on ruminal fermentation, protein degradation, and amino acid absorption in steers and on growth and feed efficiency in steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 71:3078-3086.
- Crooker, B. A., J. H. Clark, R. D. Shanks, and E. E. Hatfield. 1986. Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of heated and formaldehyde-treated soybean meal. *J. Dairy Sci.* 69:2648-2657.
- Crooker, B. A., J. H. Clark, R. D. Shanks, and G. C. Fahey, Jr. 1987. Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of feeds. *Can. J. Anim. Sci.* 67:1143-1148.
- Cros, P., R. Moncoulon, C. Bayourthe, and M. Vernay. 1992a. Effect of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in white lupin seed. *Can. J. Anim. Sci.* 72:89-96.
- Cros, P., M. Vernay, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 1992b. Influence of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in whole horsebean. *Can. J. Anim. Sci.* 72:359-366.
- Cunningham, K. D., M. J. Cecava, and T. R. Johnson. 1994. Flows of nitrogen and amino acids in dairy cows fed diets containing supplemental feather meal and blood meal. *J. Dairy Sci.* 77:3666-3675.
- Dale, N. 1996. Variation in feed ingredient quality: Oilseed meals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:129-135.

- Deacon, M. A., G. De Boer, and J. J. Kenelly. 1988. Influence of jet-sploding and extrusion on ruminal and intestinal disappearance of canola and soybeans. *J. Dairy Sci.* 71:745-753.
- de Boer, G., J. J. Murphy, and J. J. Kennelly. 1987. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegradable protein. *J. Dairy Sci.* 70:977-982.
- Demeyer, D. L., and C. J. Van Nevel. 1986. Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:161-179.
- Elimam, M. E., and E. R. Ørskov. 1984. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen. 2. The composition and particle size of the basal diet. *Anim. Prod.* 39:201-206.
- Elimam, M. E., and E. R. Ørskov. 1985. Factors affecting the fractional outflow of protein supplements from the rumen. 3. Effects of frequency of feeding, intake of water induced by the addition of sodium chloride, and the particle size of protein supplements. *Anim. Prod.* 40:309-313.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, and C. W. Cruywagen. 1994. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 77:541-551.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126:1347s-1354s.
- Firkins, J. L., M. S. Allen, B. S. Oldick and N. R. St-Pierre. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J. Dairy Sci.* 81:3350-3369.

- Folman, Y., H. Neumark, M. Kaim, and W. Kaufmann. 1981. Performance, rumen and blood metabolites in high-yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. *J. Dairy Sci.* 64:759-764.
- Fonty, G., and K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. Pages 655-680 in *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima, eds. Academic press., Orlando, Fl. USA.
- Fox, D. G., C. J. Sniffen, J. D. O'Connor, J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578-3596.
- Fraser, D. L., E. R. Ørskov, F. G. Whitelaw, and M. F. Franklin. 1991. Limiting amino acids in dairy cows given casein as the sole source of protein. *Livestock Prod. Sci.* 28:235-252.
- Gargallo, S., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2002. Effects of the level of rumen undegradable protein on microbial fermentation and amino acid flow from a continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85(Suppl. 1):241-242.
- Garrett, J. E., R. D. Goodrich, M. D. Stern, and J. C. Meiske. 1987. Rate of protein degradation and nutrient digestion of various nitrogen sources in continuous culture of rumen contents. *Can. J. Anim. Sci.* 67:745-756.
- González, J., C. A. Rodríguez, C. Centeno, and F. Lamnari. 2000. Rumen effective degradability of amino acids from soybean meal corrected for microbial contamination. *Reprod. Nutr. Dev.* 40:579-586.

- González, J., C. Centeno, F. Lamrani, and C. A. Rodríguez. 2001. In situ rumen degradation of amino acids from different feeds corrected for microbial contamination. *Anim. Res.* 50:253-264.
- Harstad O. M., and E. Prestløkken. 2000. Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (SoyPass®) determined in situ. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83:31-47.
- Hespell, R. B., and M. P. Bryant. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP} . *J. Anim. Sci.* 49:1641-1659.
- Hobson, P. N. 1988. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Science Publishers, LTD. Essex, England.
- Hoover, W. H., and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.
- Hoover, W. H., and T. K. Miller. 1992. Rumen digestive physiology and microbial ecology. Bulletin 708T. Agriculture and Forestry Experiment Station. West Virginia University.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Howie, S. A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 1996. Variation in ruminal degradation and intestinal digestion of animal byproduct proteins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:1-7.

- Hvelplund, T. 1985. Digestibility of rumen microbial protein and undegraded dietary protein estimated in the small intestine of sheep and by in sacco procedure. *Acta Agric. Scand. (Suppl)* 25 :132-144.
- Hvelplund, T., and J. Madsen. 1989. Prediction of individual amino acid passage to the small intestine of dairy cows from characteristics of the feed. *Acta Agric. Scand.* 39:65-78.
- INRA. 1988. Nutrition azotée. Pages 75-93 in: *Alimentation des bovins, ovins et caprins*. R. Jarrige (ed). INRA Publications. Paris, France.
- Jarrige, R. 1989. *Ruminant nutrition: Recommended allowances and feed tables*. Institut National de la Recherche Agronomique, Libbey, Eurotext, Paris, France.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliment.* 2:131-144.
- Jouany, J. P. 1996. Effects of rumen protozoa on nitrogen metabolism by ruminants. *J. Nutr.* 126:1335S-1346S.
- Keery, C. M., H. E. Amos, and M. A. Froetschel. 1993. Effects of supplemental protein source on intraruminal fermentation, protein degradation, and amino acid absorption. *J. Dairy Sci.* 76:514-524.
- Kernik, B. L. 1991. The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. Ph.D. Diss., University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa.
- King, K. J., J. T. Huber, M. Sadik, W. G. Bergen, A. L. Grant, and V. L. King. 1990. Influence of dietary protein sources on the amino acid profiles available for digestion and metabolism in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 73:3208-3216.

- Klusmeyer, T. H., R. D. McCarthy, Jr., and J.H. Clark. 1990. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 73:3526-3537.
- Koeln, L. L., and J. A. Paterson. 1986. Nitrogen balance and amino acid disappearance from the small intestine in calves fed soybean meal-, toasted soybean meal- or corn gluten meal-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 63:1258-1266.
- Kopecny, J., and R. J. Wallace. 1982. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1026-1033.
- Kung L., and L. M. Rode. 1996. Amino acid metabolism in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:167-172.
- Luginbuhl, J. M., K. R. Pond, and J. C. Burns. 1990. Changes in ruminal and fecal particle weight distribution of steers fed coastal bermudagrass hay at four levels. *J. Anim. Sci.* 68:2864-2873.
- Lynch, G. L., L. L. Berger, and G. C. Fahey, Jr. 1987. Effects of ethanol, heat, and lipid treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. *J. Dairy Sci.* 70:91-97.
- Mackie, R. I., and B. A. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *J. Dairy sci.* 73:2971-2995.
- Mahadevan, S., J. D. Erfle, and F. D. Sauer. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 50:723-728.
- Maiga, H. A., D. J. Schingoethe, and J. E. Henson. 1996. Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. *J. Dairy Sci.* 79:1647-1653.

- McAllan, A. B., and R. H. Smith. 1973. Degradation of nucleic acids in the rumen. *Br. J. Nutr.* 29:331-345.
- McCarthy, R. D., Jr., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, and J. H. Clark. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- McDonald, P., R. Edwards, and J. F. D. Greenhalgh. 1993. *Nutrición Animal* (4^a Ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Mehrez, A. Z., E. R. Ørskov, and I. McDonald. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- Merchen, N. R., and E. C. Titgemeyer. 1992. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. *J. Anim. Sci.* 70:3238-3247.
- Minato, H., and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:1-16.
- Minato, H., and T. Suto. 1981. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. IV. Attachment of rumen bacteria to cellulose powder and elution of bacteria attached to it. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27:21-31.
- Murphy, M. R., P. M. Kennedy, and J. G. Welch. 1989. Passage and rumination of inert particles varying in size and specific gravity as determined from analysis of faecal appearance using multicompartment models. *Br. J. Nutr.* 62:481-492.
- National Research Council (NRC). 1985. *Ruminant nitrogen usage*. National Academy Press, Washington, DC.

- National Research Council (NRC). 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. (6th rev. Ed.). National Academy Press, Washington, DC.
- National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Nat. Acad. Press, Washington, DC.
- Nocek, J. E., and J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy sci.* 71:2070-2107.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. Pages 123-143 in Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox, and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.* 71:1298-1311.
- Oldham, J. D. 1996. Protein requirement systems for ruminants. Pages 3-27 in Progress in dairy science. C. J. C. Phillips (ed). CAB International, Wallingford, UK.
- Oldham, J. D., and S. Tamminga. 1980. Amino acid utilization by dairy cows. I. Methods of varying amino acid supply. *Livest. Prod. Sci.* 7:437-452.
- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- O'Mara, F. P., J. J. Murphy, and M. Rath. 1997. The amino acid composition of protein feedstuffs before and after ruminal incubation and after subsequent passage through the intestines of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:1941-1949.

- Orpin, C. G. 1983/1984. The role of ciliate protozoa and rumen fungi in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:121-143.
- Ørskov, E. R. 1988. *Nutrición Proteica de los Rumiantes*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from adjusted rates of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499-503.
- Owens, F. N., and R. Zinn. 1988. Protein metabolism in ruminants. In *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. D. C. Church, ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Palmquist, D. L., M. R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 1993. Ruminal, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. *J. Dairy Sci.* 76:1353-1364.
- Piepenbrink, M. S., and D. J. Schingoethe. 1998. Ruminal degradation, amino acid composition, and estimated intestinal digestibilities of four protein supplements. *J. Dairy Sci.* 81:454-461.
- Polan, C. E. 1992. Protein and amino acids for lactating cows. Pages 236-247 in *Large Dairy Herd Management*. H. H. Van Horn and C. J. Wilcox, eds. American Dairy Science Association.
- Rodríguez, M. E. 2003. Factores que afectan a la fermentación microbiana y al perfil y flujo de aminoácidos de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida en un sistema de cultivo continuo. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Romagnolo, L. C., C. E. Polan, and W. E. Barbeau. 1994. Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.* 77:1093-1099.

- Rooke, J. A., B. W. Norton, and D. G. Strong. 1982. The digestion of untreated and formaldehyde treated soya-bean meals and estimation of rumen degradability by different methods. *J. Agric. Sci.* 99:441-452.
- Rulquin H. 1992. Intérêts et limites d'un apport de méthionine et de lysine dans l'alimentation des vaches laitières. *INRA Prod. Anim.* 5:29-36.
- Rulquin, H., and R. Vérité. 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. Pages 55-77 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and D. J. A. Cole, eds. Nottingham University Press.
- Rulquin, H., P. M. Pisulewski, R. Vérité, and J. Guinard. 1993. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. *Livest. Prod. Sci.* 37:69-90.
- Rulquin, H., R. Vérité, and J. Guinard-Flament. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. *INRA Prod. Anim.*, 14 (4):265-274.
- Russell, J. B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. *J. Anim. Sci.* 64:1519-1525.
- Russell, J. B., and C. J. Sniffen. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 67:987-994.
- Russell, J. B., and J. L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292:1119-1122.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy sci.* 66:763-775.

- Russell, J. B., H. J. Strobel, and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1-6.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- Santos, F. A. P., J. E. P. Santos, C. B. Theurer, and J. T. Huber. 1998. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature review. *J. Dairy Sci.* 81:3182-3213.
- Santos, K. A., M. D. Stern, and L. D. Satter. 1984. Protein degradation in the rumen and amino acid absorption in the small intestine of lactating dairy cattle fed various protein sources. *J. Anim. Sci.* 58:244-255.
- Satter, L. D. 1986. Protein supply from undegraded dietary protein. *J. Dairy Sci.* 69:2734-2749.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Schwab, C. G. 1996. Amino acid nutrition of the dairy cow: current status. Pages 184-198, in *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for feed manufacturers*. Oct. 22-24, Ithaca, NY.
- Schwab, C. G., L. D. Satter, and A. B. Clay. 1976. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *J. Dairy Sci.* 59:1254-1270.
- Schwab, C. G., C. K. Bozak, N. L. Whitehouse, and V. M. Olson. 1992. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 2. Extent of lysine limitation. *J. Dairy Sci.* 75:3503-3518.

- Setälä, J., and L. Syrjälä-Qvist. 1984-5. Degradation of crude protein and quality of undegradable protein in untreated or formaldehyde-treated rapeseed meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 12:19-27.
- Shabi, Z., H. Tagari, M. R. Murphy, I. Bruckental, S. J. Mabweesh, S. Zamwel, K. Celik, and A. Arieli. 2000. Partitioning of amino acids flowing to the abomasums into feed, bacterial, protozoal, and endogenous fractions. *J. Dairy Sci.* 83:2326-2334.
- Shaefen, D. M., C. L. Davis, and M. P. Bryant. 1980. Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 63:1248-1263.
- Shaver, R. D., A. J. Nytes, L. D. Satter, and N. A. Jorgensen. 1988. Influence of feed intake, forage physical form, and forage content on particle size of masticated forage, ruminal digesta, and feces of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:1566-1572.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577.
- Soto-Navarro, S. A., C. R. Krehbiel, G. C. Duff, M. L. Galyean, M. S. Brown, and R. L. Steiner. 2000. Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *J. Anim. Sci.* 78:2215-2222.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim. Sci.* 49:1590-1603.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in *Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or fermentation.* Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.

- Stern, M. D., and L.D. Satter. 1984. Evaluation of nitrogen solubility and the dacron bag technique as methods for estimation protein degradation in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58:714-724.
- Stern, M. D., L. M. Rode, R. W. Prange, R. H. Stauffacher, and L. D. Satter. 1983. Ruminal protein degradation of corn gluten meal in lactating dairy cattle fitted with duodenal t-type cannulae. *J. Anim. Sci.* 56:194-205.
- Stern, M. D., K. A. Santos, and L. D. Satter. 1985. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cows fed heat-treated whole soybeans. *J. Dairy Sci.* 68:45-56.
- Stern, M. D., S. Calsamiglia, and M. I. Endres. 1994a. Dynamics of ruminal nitrogen metabolism and their impact on intestinal protein supply. Proceedings of the Cornell Nutrition Conference. Oct. 18-20, Ithaca, NY.
- Stern, M. D., G. A. Varga, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, and D. L. Palmquist. 1994b. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 77:2762-2786.
- Stern, M. D., A. Bach, and S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.
- Stokes, S. R., W. H. Hoover, T. K. Miller, and R. P. Manski. 1991. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 74:860-870.
- Susmel, P., B. Stefanon, C. R. Mills, and M. Candido. 1989. Change in amino acid composition of different protein sources after rumen incubation. *Anim. Prod.* 49:375-383.

- Taghizadeh, A., M. Danesh Mesgaran, R. Valizadeh, F. Eftekhar Shahroodi, and K. Standford. 2005. Digestion of feed amino acids in the rumen and intestine of steers measured using a mobile nylon bag technique. *J. Dairy Sci.* 88:1807-1814.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* 49:1615-1630.
- Titgemeyer, E. C., N. R. Merchen, and L. L. Berger. 1989. Evaluation of soybean meal, corn gluten meal, blood meal and fish meal as sources of nitrogen and amino acids disappearing from the small intestine of steers. *J. Anim. Sci.* 67:262-275.
- Tukey, J. W. 1953. The problem of multiple comparison. Unpublished notes, Princeton University, Princeton, NJ.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Van Soest, P. J. 1994. Nitrogen metabolism. Pages 290-311 in: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Comstock. Cornell University Press.
- Van Straalen W.M., and S. Tamminga. 1990. Pages 55-72 in *Protein degradation of ruminant diets*. Wiseman J., Cole D.J.A. (Eds.), Feedstuff evaluation, Butterworth.
- Van Straalen, W. M., J. J. Odinga, and W. Mostert. 1997. Digestion of feed amino acids in the rumen and small intestine of dairy cows measured with nylon-bag techniques. *Br. J. Nutr.* 77:83-97.
- Varvikko, T., J. E. Lindberg, J. Setälä, and L. Syrjälä-Qvist. 1983. The effect of formaldehyde treatment of soya-bean meal and rapeseed meal on the amino acid

- profiles and acid-pepsin solubility of rumen undegraded protein. *J. Agric. Sci., Cambridge* 101:603-612.
- Vendrell, J., and F. X. Avilés. 1986. Complete amino acid analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 358:401-413.
- Vérité, R., and J. L. Peyraud. 1989. Protein: the PDI system. Pages 33-48 in *Ruminant nutrition: Recommended allowances and feed tables*. Jarrige, R. (Ed.), Institut National de la Recherche Agronomique, Libbey, Eurotext, Paris, France.
- Wallace, R. J. 1985. Absorption of soluble proteins to rumen bacteria and the rate of absorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.* 53:399-408.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.* 126:1326S-1334S.
- Wallace, R. J., and K. N. Joblin. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 29:19-25.
- Wallace, R. J., and C. A. Munro. 1986. Influence of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* on the proteolytic activity of a defined mixture of rumen bacteria growing on a solid substrate. *Lett. Appl. Microbiol.* 3:23-26.
- Wallace, R. J., and C. A. McPherson. 1987. Factors affecting the rate of break down of bacterial protein in rumen fluid. *Br. J. Nutr.* 58:313-323.
- Wallace, R. J., and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 217-249 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science.

- Wallace, R. J., L. Arthaud, and C. J. Newbold. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1762-1767.
- Wallace, R. J., R. Onodera, and M. A. Cotta. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 283-328 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, and C. S. Stewart (Eds.), Chapman and Hall, London.
- Waltz, D. M., and S. C. Loerch. 1986. Effect of acid and alkali treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 63:879-887.
- Waltz, D. M., and M. D. Stern. 1989. Evaluation of various methods for protecting soybean protein from degradation by rumen bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 25:111-122.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Whetstone, H. D., C. L. Davis, and M. P. Bryant. 1981. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 55:803-809.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and T. Lykos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Windschitl, P. M., and M. D. Stern. 1988. Evaluation of calcium lignosulfonate-treated soybean meal as a source of rumen protected protein for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 71:3310-3322.

Yoon, I. K., K. J. Lindquist, D. D. Hongerholt, M. D. Stern, B. A. Crooker and K. D. Short. 1996. Variation in menhaden fish meal characteristics and their effects on ruminal protein degradation as assessed by various techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:13-27.